



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Caracterización molecular de *Andiniastra violascens*:
código de barra de ADN, diversidad genética y
relaciones filogenéticas dentro de la familia
Clausiliidae (Gastropoda) de distribución mundial**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Jaime Gerardo MORÍN LAGOS

ASESOR

Rina Lastenia RAMIREZ MESIAS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Morín, J. (2018). *Caracterización molecular de Andiniastra violascens: código de barra de ADN, diversidad genética y relaciones filogenéticas dentro de la familia Clausiliidae (Gastropoda) de distribución mundial*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



17 p. R
114 p. A

Universidad Nacional Mayor De San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 17.15 horas del 09 de octubre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de JAIME GERARDO MORIN LAGOS.

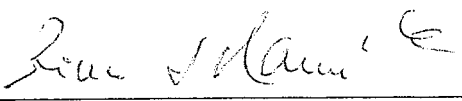
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 012-EPGB-2018, el titulando expuso su tesis: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Andiniastra violascens*: CÓDIGO DE BARRA DE ADN, DIVERSIDAD GENÉTICA Y RELACIONES FILOGENÉTICAS DENTRO DE LA FAMILIA CLAUSILIIDAE (GASTROPODA) DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL" y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20..., calificativo: A.P.R.O.B.A.D.O. CON MÉRITOS MAXIMOS. HONORES

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a JAIME GERARDO MORIN LAGOS y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de octubre de 2018.


Dra. DIANA SILVA DAVILA
(PRESIDENTA)


Dra. RINA RAMIREZ MESIAS
(ASESORA)

Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(MIEMBRO)


Mg. GUILLERMO ALVAREZ BEJAR
(MIEMBRO)

“Life finds a way”
-Jurassic Park-

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque sin ellos nada de esto sería posible, ni mi carrera en ciencias ni la realización de este trabajo de investigación, gracias por su ejemplo, apoyo y comprensión en este proceso.

A mis hermanos, que me vieron pasar por este proceso, gracias por su apoyo.

A mi asesora de tesis, la Dra. Rina Ramírez, por todo el asesoramiento y seguimiento de esta investigación, gracias por siempre preocuparse y ayudarme.

A mis compañeros del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, en especial a Paola Aguirre, María Solís, Thalía Silvestre, Fátima Rivera, Diana Cubas y David Morales por sus aportes a manera de retroalimentación y asistencia en los procedimientos moleculares, de igual manera a Víctor Jiménez por sus consejos en los análisis bioinformáticos.

Un agradecimiento especial a mis amigos, David Reyes, Baruk Urbina, Renato Bernuy, Juan Castillo y José Madrid por su interés y preguntas sobre esta investigación ya que me ayudaron a ordenar mis ideas en términos sencillos.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis de grado fue posible gracias al fondo otorgado por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a través del Vicerrectorado de Investigación, que complementó lo cubierto por los proyectos de investigación bajo la responsabilidad de la Dra. Rina Ramírez, los cuales fueron el Proyecto CON-CON VRI 141001031 y el Proyecto Especial del Rectorado R.R. N° 03761-R-15.

DEDICATORIA

A todos los científicos que con mucho esfuerzo, y pese a las limitaciones que existen en nuestro país, aportan conocimiento para entender y conservar nuestra biodiversidad.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Marco Teorico	4
2.1 Los Moluscos Terrestre de Perú: La familia Clausiliidae	4
2.2 La Subfamilia Peruiniinae	9
2.2.1 <i>Andiniastra violascens</i> Nordsieck, 2005	10
2.2.2 <i>Cylindronenia cicatricosa leimebambensis</i> Nordsieck, 1999	12
2.2.3 <i>Symptychiella</i> Nordsieck, 1999	13
2.3 Marcadores Moleculares: <i>COI</i> , <i>16S rRNA</i> y <i>28S rRNA</i>	15
2.3.1 Marcadores moleculares mitocondriales: <i>COI</i> & <i>16S rRNA</i>	15
2.3.2 Marcador molecular nuclear: <i>28S rRNA</i>	16
2.4 Empleo de marcadores moleculares en la Sistemática Molecular y Filogeografía de Clausiliidae	16
2.4.1 Código de Barras de ADN	17
2.4.2 Datos moleculares y claves taxonómicas	19
2.4.3 Filogenia molecular mundial de Clausiliidae	21
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 Hipótesis	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1 Zonas de Muestreo	25
5.2 Documentación y preparación de las muestras biológicas para extracción de ADN	35
5.3 Fotografías y tomas de Rayos X	36
5.4 Extracción y Cuantificación de ADN genómico	41
5.5 Amplificación de secuencias de ADN por PCR	41
5.6 Visualización de amplicones	45
5.7 Purificación de amplicones y secuenciamiento	46
5.8 Edición y Alineamiento múltiple de secuencias	46
5.9 Minería de datos y cobertura de géneros estudiados	47
5.10 Caracterización de las secuencias	51
5.11 Código de barras de ADN	52
5.12 Posición y origen de <i>Andiniastra violascens</i> dentro de la familia Clausiliidae y tiempos de divergencia	52

6. Resultados	54
6.1 Resultados Generales de los Procedimientos Moleculares	54
6.2 Caracterización de las secuencias de ADN	60
6.3 Posición evolutiva de <i>Andiniastra violascens</i> en la filogenia de Clausiliidae a nivel mundial	64
6.4 Relaciones filogenéticas de Peruiniinae reveladas mediante los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA	67
6.5 Diversidad intraespecífica en Peruiniinae	73
6.6 Código de Barras de ADN	76
6.7 Divergencia entre <i>Andiniastra violascens</i> y <i>Andiniastra aff. violascens</i>	80
6.7.1 Diferencias aminoacídicas	80
6.7.2 Tiempos de divergencia	82
6.8 Estructura secundaria de rRNA en Peruiniinae	83
6.9 Diferenciación morfológica de <i>Andiniastra</i> spp.	85
7. Discusión	91
7.1 Distribución de <i>Andiniastra violascens</i> y el efecto del hombre en su hábitat	91
7.2 Extracción de ADN de muestras preservadas de Peruiniinae	92
7.3 Uso de MgCl ₂ a 0.5M para amplificar el marcador 28S rRNA mediante los cebadores utilizados por Uit de Weerd & Gittenberger	92
7.4 Alineamiento de COI, 16S rRNA y 28S rRNA con referencias para este último	94
7.5 Estructura secundaria de 16S rRNA de Peruiniinae	95
7.6 Código de barras de ADN	96
7.7 Posición evolutiva de <i>Andiniastra</i> y <i>Symptychiella</i> en la subfamilia Peruiniinae y tiempos de divergencia	98
7.8 Posición taxonómica de <i>Andiniastra aff. violascens</i>	101
8. Conclusiones	104
9. Recomendaciones	105
10 Referencias Bibliográficas	107
11. Anexos	114

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

Figuras

Figura 1. Ilustración esquemática del Aparato Clausilial (CA). Vista frontal “lamella” (izquierda) y vista dorsal “plicae” (derecha). Tomado de Irikov & Georgiev (2015)	6
Figura 2. Distribución de los siete principales clados de la familia Clausiliidae, cada uno de ellos es ahora considerado una subfamilia (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).	8
Figura 3. Distribución de los géneros de Clausiliidae en Perú (Szekeres 1984). La diversidad de géneros está indicada por la variedad de símbolos. Las áreas de bosque húmedo se encuentran al este de la línea no continua.....	9
Figura 4. Extracto de la filogenia de la Familia Clausiliidae (Uit de Weerd & Gittenberger 2013) mostrando las especies utilizadas de la tribu Peruiiniini (Clausiliidae Sudamericanos).	11
Figura 5. 1 – 2, <i>C. cicatricosa cicatricosa</i> (Loosjes & Loosjes-van Bommel, 1989). 3 – 4 <i>C. cicatricosa leimebambensis</i> (Nordsieck 1999). Modificado de Nordsieck 1999	12
Figura 6. Distribución de algunas especies y subespecies de <i>Symptychiella</i> . Extraído del Mapa 2 de Nordsieck (2010) – <i>S. bilamellata costulata</i> (1, 2 y 3), <i>S. b. laevigata</i> (4), <i>S. fratermajor</i> (4), <i>S. christae</i> (5), <i>S. b. bilamellata</i> (6), <i>S. elegantissima</i> (6), <i>S. acuminata</i> (7), <i>S. b. gracilicosta</i> (8), <i>S. annae</i> (9 y 10).	14
Figura 7. Árbol de la vida y los marcadores moleculares estandarizados para cada grupo (Kress et al 2014)	18
Figura 8. Relaciones filogenéticas basadas en COI contrastado con la morfología de la conchilla de <i>Alopiia</i> . Se puede observar la ocurrencia paralela en diferentes clados de esta subfamilia (Fehér et al. 2013)	20
Figura 9. Conchilla de Clausiliidae con apertura no apostrófica (A), semi-apostrófica (B) y apostrófica (C) respectivamente (Uit de Weerd & Gittenberger 2013)	21
Figura 10. Zona de muestreo de <i>Andiniastra violascens</i> . Origen del holotipo SMF 328068 (puntero rojo inferior) y punto de muestreo en este estudio (puntero rojo superior). Ambos puntos separados por alrededor de 500 metros.....	27
Figura 11. Puntos de muestreo. En el recuadro amarillo se muestra lo que se encontró en cada punto, también se señala el punto de recolección del holotipo original de Nordsieck 2005. La distancia entre el muestreo de organismos vivos y el de conchillas es de aproximadamente 5 km	28
Figura 12. Zona de Muestreo de <i>Andiniastra aff. violascens</i> . Se realizó en los alrededores de la localidad de Santo Tomás (resaltado), Provincia de Cutervo – Cajamarca, se muestra su cercanía al río Marañón. Las líneas punteadas indican	

la frontera entre Amazonas y Cajamarca. En la esquina inferior derecha se ofrece una escala de 3 km.	29
Figura 13. Zona de muestreo de <i>Cylindronenia cicatricosa leimebambensis</i> . Distrito de Leimebamba, Provincia de Chachapoyas – Amazonas (Puntero rojo). Cerca al río Marañón. Las zonas punteadas indican las fronteras Cajamarca – Amazonas (izquierda) y Amazonas - San Martín (derecha)	30
Figura 14. Zona de muestreo de <i>Symptychiella sp.</i> Cerca de Juan Guerra, Provincia de Lamas – San Martín. Cerca al río Huallaga	31
Figura 15. Vista general de las zonas de muestreo con coordenadas. Departamentos de Cajamarca, Amazonas y San Martín (de izquierda a derecha).	32
Figura 16. Fotografías de la Localidad Tipo de <i>Andiniastra violascens</i> en la Provincia de Bongará, Amazonas. Paredones y vegetación junto a la carretera Chachapoyas – Pedro Ruiz Gallo y al río Uctubamba	33
Figura 17. (A) El río Marañón y los departamentos de Amazonas (margen derecha) y Cajamarca (margen izquierda). (B) Fotografía tomada desde Malleta (Cajamarca), punto cercano a Santo Tomás (Cajamarca).	34
Figura 18. <i>Andiniastra violascens</i> . (Altura = 22 mm). AMAZONAS. Fotografía por Jaime Morín.....	37
Figura 19. <i>Andiniastra aff. violascens</i> (Altura = 32 mm). CAJAMARCA. Fotografía por Jaime Morín	38
Figura 20. <i>Cylindronenia cicatricosa leimebambensis</i> (Altura = 22 mm). AMAZONAS. Fotografía por Jaime Morín	39
Figura 21. <i>Symptychiella sp.</i> (Altura = 16 mm). SAN MARTÍN. Fotografía por Jaime Morín.....	40
Figura 22. Marcador nuclear 28S rRNA. Esquema de la posición de los cebadores en el gen ribosomal 28S rRNA, cada par de cebadores tiene un color diferente	43
Figura 23. Secuencia de ADN nuclear 5.8S rRNA, ITS2 y 28S rRNA de <i>Andiniastra violascens</i> de código “R2” y los sitios de unión a los cebadores que se usaron. Los cebadores “hacia delante” están resaltados en fucsia y los reversos en naranja. Obtenido con la herramienta “Primer Map” en “Sequence Manipulation Suite” (Stothard 2000).	43
Figura 24. Resultados de la búsqueda de secuencias parecidas a las que obtuvimos en la base de datos de NCBI usando BLAST.	48
Figura 25. Gel de electroforesis del marcador 16S rRNA, agarosa 2%, T _m =52°C, amplicón de aproximadamente 300 pb. Protocolos y cebadores de Ramírez (2004).	56
Figura 26. Gel de electroforesis del marcador COI, agarosa 1%, T _m =46°C, amplicón de aproximadamente 700 pb. Protocolos y cebadores (Folmer et al	

1994), (Ramírez 2004). T25 – T28 con bandas múltiples, se solucionó aumentando la temperatura.57

Figura 27. Gel de electroforesis del marcador 28S-I “1128-2119”, agarosa 1%, $T_m=54^\circ\text{C}$, amplicón de aproximadamente 900 pb. Cebadores descritos en Uit de Weerd & Gittenberger (2013). Bandas múltiples en todos los amplicones, no se logró solucionar variando la temperatura de hibridación.57

Figura 28. Ensayo de gradientes de concentración de MgCl_2 . Gel de electroforesis del marcador 28S-I “1128-2119”, agarosa 1%, $T_m=50^\circ\text{C}$. El mejor resultado se obtuvo con concentraciones de 0.5mM y 1.0mM y se optó por el primero en las siguientes reacciones.59

Figura 29. Gel de electroforesis de los dos marcadores 28S “1128-2119” y “S2-1145”, agarosa 2%, $T_m=52^\circ\text{C}$. Protocolo estandarizado en este estudio modificando la concentración de MgCl_2 de 1.5mM a 0.5mM.59

Figura 30. Alineamiento de las secuencias de COI. Vista esquemática del alineamiento obtenido usando ClustalX implementado en Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.....61

Figura 31. Alineamiento de las secuencias de 16S rRNA. Vista esquemática del alineamiento obtenido usando ClustalX implementado en Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.....61

Figura 32. Alineamiento de las secuencias de 28S rRNA. Vista esquemática del alineamiento obtenido del plug-in ClustalX en el programa Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.....62

Figura 33. Análisis de la saturación molecular en el marcador COI. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo K80; s: transiciones; v: transversiones.....62

Figura 34. Análisis de la saturación molecular en el marcador 16S rRNA. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo K80; s: transiciones; v: transversiones.63

Figura 35. Análisis de la saturación molecular en el marcador 28S rRNA. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo F84; s: transiciones; v: transversiones.....63

Figura 36. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) basado en el marcador nuclear 28S rRNA usando PhyML bajo el modelo GTR+I+G seleccionado por AIC con JModelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte bootstrap (1000 repeticiones). El clado Peruiniinae se encuentra resaltado de verde y los nombres en azul representan las secuencias de este estudio.....65

- Figura 37.** Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana (IB) basado el marcador molecular 28S rRNA usando MrBayes bajo el modelo SYM+G seleccionado previamente para cada uno por AIC en MrModeltest. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un bur-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética y los nodos muestran la probabilidad posterior. El clado Peruiniinae se encuentra resaltado de verde y los nombres en azul representan las secuencias de este estudio66
- Figura 38.** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) basado en el marcador mitocondrial COI. Realizado en PhyML con el modelo GTR+I seleccionado por el criterio AIC en JModelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* (1000 repeticiones).68
- Figura 39.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) basado en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Realizado PhyML con el modelo TPM2uf+G seleccionado por el criterio AIC en JmodelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* (1000 repeticiones).69
- Figura 40.** Árbol bayesiano (IB) basado en el marcador molecular COI usando MrBayes con el modelo SYM+G seleccionado por AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un burn-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.70
- Figura 41.** Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana (IB) basado en el marcador molecular 16S rRNA usando MrBayes con el modelo SYM+G seleccionado por AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un burn-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.71
- Figura 42.** Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana (IB) basado en los marcadores concatenados COI y 16S rRNA usando MrBayes bajo el modelo SYM+G seleccionado previamente para cada uno por el criterio AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un bur-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior72
- Figura 43.** Árbol filogenético según el método del vecino más cercano (NJ) basado en la relación entre las secuencias del marcador COI obtenidas en este estudio. Lós códigos de las muestras de ADN se encuentran al final del nombre de la especie.75

Figura 44. Árbol filogenético según el método del vecino más cercano (NJ) basado en la relación entre las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas en este estudio. Los códigos de las muestras de ADN se encuentran al final del nombre de la especie.	75
Figura 45. Cladograma circular por el método del Vecino más cercano (NJ) de las secuencias Nucleotídicas de COI bajo el modelo K2P. Obtenido en BOLD systems	77
Figura 46. Códigos de Barras de las secuencias COI de Peruiniinae	78
Figura 47. Búsqueda del marco de lectura de la secuencia de COI de <i>Andiniastra</i> en ExPASy. Se muestran los seis marcos de lectura, se puede observar muchos codones de término (“Stop”) en todos salvo en el 5’-3’ Marco de lectura 3 (“Fram 3”).....	79
Figura 48. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de <i>Andiniastra</i> . Se muestran los cuatro cambios diagnósticos resaltados en amarillo. ST: Santo Tomas (<i>Andiniastra aff. violascens</i>); LT: Localidad Tipo (<i>Andiniastra violascens</i>). Realizado en MEGA7.....	81
Figura 49. Árbol ML de Peruiniinae y Tiempos de Divergencia. Los nodos representan el tiempo de Divergencia aproximado en Ma. En amarillo se resalta el clado de <i>Andiniastra</i>	82
Figura 50. Motivos F1 y G2 (parcial) de 16S rRNA de Peruiniinae y <i>Albinaria coerulea</i> . Estos motivos son altamente conservados. F1 y F1’ son complementarios y se unen formando un tallo, la secuencia del medio forma un bucle.....	83
Figura 51. Motivos G6 y G7 de 16S rRNA de Peruiniinae y <i>Albinaria coerulea</i> . Estos motivos son altamente conservados. G6 y G6’ son complementarios y se unen formando un tallo, lo mismo ocurre con G7 y G7’, las secuencias del medio forma un bucle que varía de 8 a 12 pares de bases en el motivo G7.	84
Figura 52. Representación gráfica de la estructura secundaria de los motivos G6 y G7 del 16S rRNA de los Peruiniinae estudiados, el bucle del motivo G7 es muy variable mientras que el de G6 está muy conservado. Las estructuras fueron graficadas en la plataforma de internet http://rna.tbi.univie.ac.at/forma/ (Kerpedjiev <i>et al.</i> 2015).	84
Figura 53. <i>Andiniastra violascens</i> . (Vista aumentada). AMAZONAS Fotografía por Jaime Morín.	86
Figura 54. <i>Andiniastra aff. violascens</i> . (Vista Aumentada). CAJAMARCA Fotografía por Jaime Morín.	86

- Figura 55.** Estructura interna de *Andiniastra aff. violascens*, vista dorsal (A) y frontal (B). Clausilum de *Andiniastra aff. violascens* (C) y de *Andiniastra violascens* (D). Fotografía por Jaime Morín.....87
- Figura 56.** Rayos X en *Andiniastra violascens*. Vista frontal (izquierda) y laterales (centro y derecha). Se observa la lamela inferior (il) y superior (sul). 40 segundos de exposición.87
- Figura 57.** Rayos X en *Andiniastra aff. violascens*. Vista frontal (izquierda) y laterales (centro y derecha). Se observa la lamela inferior (il) y superior (sul). 40 segundos de exposición.....88
- Figura 58.** Rayos X de *Andiniastra violascens* (derecha) y *A. aff. violascens* (izquierda) en vista dorsal. 35 segundos de exposición. La forma de la lunela (lun) y plica principal (pri) es diferente en ambas poblaciones.....89

Tablas

Tabla 1. Coordenadas de muestreo en este estudio. Las colectas se realizaron en los puntos señalados y sus alrededores mediante caminatas de varios kilómetros a pie	26
Tabla 2. Codificación de los especímenes usados en este estudio	37
Tabla 3. Cebadores usados en este estudio y su origen.	44
Tabla 4. Ciclaje de la amplificación por PCR.	45
Tabla 5. Cobertura de 40.7%. En este estudio se han utilizado secuencias de 28S rRNA de 11 de los 27 géneros de Peruiniini descritos.	49
Tabla 6. Secuencias de 28S rRNA de Clausiliidae obtenidas de GenBank que fueron usadas como grupos externos. Todas las secuencias provienen de Uit de Weerd & Gittenberger (2013) excepto EU409911.1 (Uit de Weerd, 2008).....	50
Tabla 7. Resultados de la cuantificación de ADN y lista de los marcadores moleculares secuenciados.	55
Tabla 8. Variación genética de los marcadores COI, 16S rRNA y 28S rRNA	60
Tabla 9. Variación genética de 706 posiciones del marcador molecular COI realizado en MEGA7; N: número de secuencias; h: número de haplotipos; S: número de sitios segregantes; Ps: S/N; π : diversidad nucleotídica; θ : estadístico theta; Nd: No se puede determinar.	73
Tabla 10. Variación genética de 332 posiciones del marcador molecular 16S realizado en MEGA7; N: número de secuencias; h: número de haplotipos; S: número de sitios segregantes; Ps: S/N; π : diversidad nucleotídica; θ : estadístico theta; Nd: No se puede determinar.	74
Tabla 11. Distancias genéticas y brechas en los códigos de barras. Se evidencia que la distancia genética a pares máxima dentro de una especie es inferior a la distancia genética de esa especie con la especie más cercana.	79
Tabla 12. Cambios aminoacídicos diagnóstico en <i>Andiniastra</i> y los cambios nucleotídicos en las secuencias de COI que las originaron.	80

RESUMEN

Los Clausiliidae son un grupo de caracoles terrestres que muestran altas tasas de variación molecular y adaptación a su medio por lo que son excelentes modelos para estudios de adaptación y especiación. A esta familia pertenece *Andiniastra violascens* que fue descrita por primera vez en el valle del río Uctubamba (Nordsieck, 2005), sin embargo, la descripción de esta especie en el nuevo género *Andiniastra* se basó únicamente en características de la conchilla y no se han reportado estudios posteriores. Además, hasta la fecha tampoco se cuenta con información molecular de otros Clausiliidae peruanos salvo las pocas secuencias de marcadores nucleares obtenidas por Uit de Weerd & Gittenberger (2013). Dentro de los esfuerzos del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se han logrado coleccionar muestras vivas de Peruniinae provenientes de la selva y sierra peruana, lo que nos provee más evidencia morfológica y ponen a disposición el material genético necesario para estudios a nivel molecular.

En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de *A. violascens* (Amazonas) y se obtuvo su posición filogenética dentro de la subfamilia Peruniinae. Además, se aprovechó el material disponible en la colección científica de Malacología del Museo de Historia Natural de la UNMSM para caracterizar y evaluar molecularmente a los Clausiliidae peruanos del género *Cylindronenia* (Amazonas) y *Symptychiella* (San Martín) y a una población de *Andiniastra sp.* colectada en Cajamarca.

Se estandarizaron los protocolos moleculares necesarios para obtener secuencias del marcador nuclear 28S rRNA. De esta manera, se obtuvieron por

primera vez secuencias de *Andiniastra* y *Symptychiella*, aumentando así la cobertura de géneros de Peruiniinae a 40.7% de los 27 géneros descritos para ese grupo. El análisis de estas secuencias de ADN evidenció que el género *Andiniastra* es monofilético y comparte un ancestro común con el clado conformado por *Andinia* (género al que *A. violascens* fue asignada inicialmente), *Steeriana* y *Cylindronenia*, mientras que *Symptychiella* estaría formando un clado muy bien soportado con *Zilchiella*. Además, se generaron secuencias mitocondriales de COI (28 secuencias) y 16S rRNA (31 secuencias), las cuales representan las primeras en su tipo para Peruiniinae, que se utilizaron para evaluar la variación intraespecífica y la utilidad de ellas como código de barras.

Finalmente, las diferencias morfológicas encontradas en el análisis inicial, la divergencia genética en base a los marcadores COI, 16S rRNA y 28S rRNA, los cambios hallados en las secuencias aminoacídicas deducidas de COI y los análisis de estructuras secundarias de 16S rRNA sugieren que *Andiniastra sp.* podría ser en realidad un nuevo taxón. Adicionalmente, se realizó una calibración secundaria del árbol ML y se encontró que *A. violascens* (Amazonas) y *Andiniastra sp.* (Cajamarca) divergieron hace aproximadamente 12.3 millones de años lo que concuerda con el periodo de levantamiento acelerado de los Andes (entre 10 y 5 Ma), evento que pudo haber influenciado en la especiación de este género.

Palabras claves: *Peruiniinae*, *28S rRNA*, *COI*, *16S rRNA*, *filogenia molecular*

ABSTRACT

Clausiliidae is a group of terrestrial snails that show high rates of molecular variation and adaptation to their environment, making them excellent models for adaptation and speciation studies. This family includes *Andiniastra violascens* which was first described in the Uctubamba river valley (Nordsieck, 2005), however, the description of this species in the new genus *Andiniastra* was based solely on characteristics of the shell and no further studies have been reported. In addition, to date there is no molecular information from other Peruvian Clausiliidae except for the few nuclear marker sequences obtained by Uit de Weerd & Gittenberger (2013). Within the efforts of the laboratory of Molecular Systematics and Phylogeography of the National University of San Marcos, live samples of Peruniinae from the Peruvian jungle and highlands have been collected, which provides us with more morphological evidence and make available the necessary genetic material for studies at the molecular level.

In the present work, the molecular characterization of *A. violascens* (Amazonas) was carried out and its phylogenetic position was obtained within the subfamily Peruniinae. In addition, the material available in the scientific collection of Malacology of the Museum of Natural History of the UNMSM was used to characterize and molecularly evaluate the Peruvian Clausiliidae of the genus *Cylindronenia* (Amazonas) and *Symptychiella* (San Martín) and a population of *Andiniastra* sp. collected in Cajamarca.

The molecular protocols necessary to obtain sequences from the nuclear marker 28S rRNA were standardized. Thus, sequences of *Andiniastra* and *Symptychiella*

were obtained for the first time, increasing the coverage of Peruiniinae genera to 40.7% of the 27 genera described for that group. The analysis of these DNA sequences showed that the genus *Andiniastra* is monophyletic and shares a common ancestor with the clade formed by *Andinia* (genus to which *A. violascens* was initially assigned), *Steeriana* and *Cylindronenia*, while *Symptychiella* would be forming a very well-supported clade with *Zilchiella*. In addition, mitochondrial sequences of COI (28 sequences) and 16S rRNA (31 sequences) were generated, which represent the first in their type for Peruiniinae, which were used to evaluate intraspecific variation and their usefulness as barcodes.

Finally, the morphological differences found in the initial analysis, the genetic divergence based on the COI, 16S rRNA and 28S rRNA markers, the changes found in the amino acid sequences deduced from COI, and the secondary structure analyses of 16S rRNA suggest that *Andiniastra sp.* could actually be a new taxon. Additionally, a secondary calibration of the ML tree was performed and it was found that *A. violascens* (Amazonas) and *Andiniastra sp.* (Cajamarca) diverged approximately 12.3 million years ago which is consistent with the accelerated uplift period of the Andes (between 10 and 5 Ma), an event that may have influenced the speciation of this genus.

Keywords: Peruiniinae, 28S rRNA, COI, 16S rRNA, Molecular phylogeny

1. INTRODUCCIÓN

Perú es uno de los países más megadiversos del mundo por lo que cuenta con un gran número de recursos tanto mineros como biológicos. Específicamente sobre la biodiversidad en la cuenca de la Amazonía andina (perteneciente a Perú y Bolivia) sabemos que es una de las zonas más ricas en especies y rápidamente cambiantes del mundo, sus características climáticas únicas han moldeado una gran cantidad de especies haciendo que muchos expertos coincidan en que esta área alberga una tasa extremadamente alta de especies endémicas, quizás la mayor en el mundo. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce acerca de la distribución geográfica de estas especies y ecosistemas dentro de los límites de los países (Swenson *et al.* 2012).

Investigaciones en grandes grupos de animales son de conocimiento público y son indicadores de la riqueza de la región, por ejemplo, en cuanto a mamíferos, Perú cuenta con 508 especies nativas, resultando como el tercer país con la mayor diversidad de estas especies en el Nuevo Mundo, después de Brasil y México, así como quinto en el mundo. De éstas, 65 especies (12,8%) son endémicas y la mayoría de ellas se encuentran restringidas a las Yungas de la vertiente oriental de los Andes (39 especies, 60%) seguida de lejos por la Selva Baja (14 especies, 21,5%) (Pacheco *et al.* 2009). En cuanto a aves, Perú posee 1835 especies, lo que nos coloca entre los primeros países en número de aves, de estos, 131 son especies endémicas, o sea un aproximado del 7% (Plenge 2010). En cuanto a peces, se estima que existen alrededor de 1300 especies de peces continentales para el Perú (Ortega *et al.* 2012) lo que representa aproximadamente un 20% del total de especies de Sudamérica y que la mayor parte se encuentra en la cuenca amazónica; en el caso de los Andes se tiene

que de las 80 especies registradas por Ortega (1992) que se encuentra a más de 1000 msnm, más de 50 son endémicas (62.5%). En cuanto a plantas, cabe destacar que los Andes tropicales albergan el doble de cantidad de especies de plantas que el segundo punto más diverso en el mundo (Sanín *et al.* 2016).

Andiniastra violascens es una especie endémica de caracol terrestre que pertenece a la familia Clausiliidae, familia que se conoce como el grupo de los “caracoles puerta” (*door snails*) debido a una característica compartida llamada clausilium. Fue reportada por primera vez por Hartmut Nordsieck en el año 2005 basándose en los clásicos marcadores morfológicos de su conchilla, describiendo un nuevo género con esta única especie. Inicialmente, y hasta la fecha, se le atribuye a *Andinia* como su género hermano, sin embargo, no se han registrado estudios posteriores a los realizados para la descripción original de la especie.

Los Clausiliidae son un grupo de caracoles terrestres muy importantes ya que muestran las mayores tasas de variación molecular y adaptación a su medio por lo que son excelentes modelos para estudios de adaptación y especiación. Se han hecho muchos estudios a nivel morfológico para poder clasificar e inferir relaciones evolutivas en este grupo de especies alrededor del mundo, sin embargo en estudios posteriores usando técnicas moleculares se han evidenciado ciertos conflictos y contradicciones en la filogenia tradicional de esta familia, por ejemplo, mediante el uso de los marcadores moleculares de los genes 28S rRNA, H3 y H4, Dennis Uit de Weerd y Edmund Gittenberger (2013) reportaron que todos los caracteres morfológicos de las conchas, utilizadas en la clasificación clásica de Clausiliidae, eran homoplasias a nivel de subfamilia. En el mismo estudio se realizó una primera filogenia mundial de la familia

Clausiliidae en donde utilizaron secuencias de ADN de una cantidad representativa de especies de cada uno de sus grupos más importantes, entre ellas se utilizaron especies de Sudamérica. Sin embargo, aún queda pendiente dilucidar la posición filogenética de una cantidad muy importante de especies peruanas de Clausiliidae.

Dentro de los esfuerzos del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, liderados por la Dra. Rina Ramirez, se han logrado colectar muestras vivas de diferentes especies de caracoles peruanos, entre ellos a los Clausiliidae provenientes de la selva y sierra del Perú; a diferencia de la mayoría de estudios previos hechos por otros investigadores, no solo hemos logrado colectar conchillas sino también a los organismos vivos que nos proveen más evidencia morfológica y nos dan material genético para estudios a nivel molecular. De esta manera este estudio es un primer esfuerzo por entender la posición evolutiva de *Andiniastra violascens* dentro de la filogenia mundial de Clausiliidae mediante marcadores moleculares, además, de manera indirecta también será evaluada y comparada con otro grupo de Clausiliidae peruanos que se han colectado en regiones cercanas para los cuales también es novedoso el uso de métodos moleculares.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Los Moluscos Terrestres de Perú: La familia Clausiliidae

Los Gasterópodos (Mollusca) son una parte muy importante de muchas comunidades ecológicas, se encuentran dentro de los más evolutivamente exitosos grupos animales que habitan la tierra, habitan en casi todos los ambientes marinos, de agua dulce y terrestres y han alcanzado una gran diversidad en todas las categorías taxonómicas que solo es superada por los insectos (Mcarthur & Harasewych 2003).

En cuanto a la cantidad de moluscos terrestres de Perú se reconocen un total de 763 especies (Ramírez *et al.* 2003) y que, tomando en consideración que deberían existir entre 30000 y 35000 especies de caracoles terrestres según Solem (1984), constituyen el 2.5% del total mundial. Para América del Sur esto corresponde a un 38.15% del total de 2000 especies reportadas en el año 1971, siendo el país con más especies reportadas. En base a esta diversidad, en el mismo reporte hecho por Ramírez y colaboradores se menciona que la familia Bulimulidae ostenta el primer lugar en número de especies reportadas (424), no obstante, éstas son solo distribuidas en 15 géneros, que es una cantidad menor comparada a los 17 géneros en los que están distribuidas las 75 especies de la familia Clausiliidae (segunda familia con más números de géneros registrados). La familia Clausiliidae pertenece a la subclase Pulmonata, orden Stylommatophora, y se caracteriza por poseer una conchilla con forma de torre o fusiforme con algunos o muchos pliegues en la apertura, además son fácilmente reconocibles porque presentan a menudo una característica sinapomórfica llamada el aparato clausilial (CA) (Loosjes 1953). Este aparato clausilial es un complejo aparato de cierre de la apertura formado dentro del

cuerpo del verticilo, su nombre lo debe al clausilium, que es una placa movable a manera de puerta que está conectada a la columela por un tallo largo y flexible. Cuando el tejido suave del caracol se retira, el clausilium cierra la apertura de la conchilla al descansar sobre las lamelas que son dentículos alargados tipo diente (Gittenberger 2000).

De acuerdo con Nordsieck (1982), el aparato clasulial (Figura 1) está conformado por el clausilium que a su vez está formado por un tallo “clausilium stalk” (cs) y una placa “clausilium plate” (cp); una lamela que se puede dividir en lamela inferior o columelar (il), lamela espiral (spl) y lamela superior o parietal (sul); una lamela subcolumelar (scl) y, a menudo, una lamela paralelar (pll). Visto dorsalmente resaltan las siguientes estructuras: a) Plica principal o “principalis” (pri); b) Plica palatal o “lunellar”: Plica palatal superior “upper plica” (up) con una parte anterior (ups) y posterior (upp) en presencia de lunella, plica palatal media o lunella (lun), plica palatal inferior “lower plica” (lp) con una parte anterior o “basalis” (bas) y una parte posterior o “subclaustralis” (scs) en presencia de la lunella; c) Plica palatal más baja o “sulcalis” (sulc). Además, en el caso que “sulcalis” y “subclaustralis” se encuentren fusionadas o indistinguibles se debe usar el término “plica palatal posterior baja”. También es común encontrar una plica sutural “suturalis” (sut) cerca de la sutura.

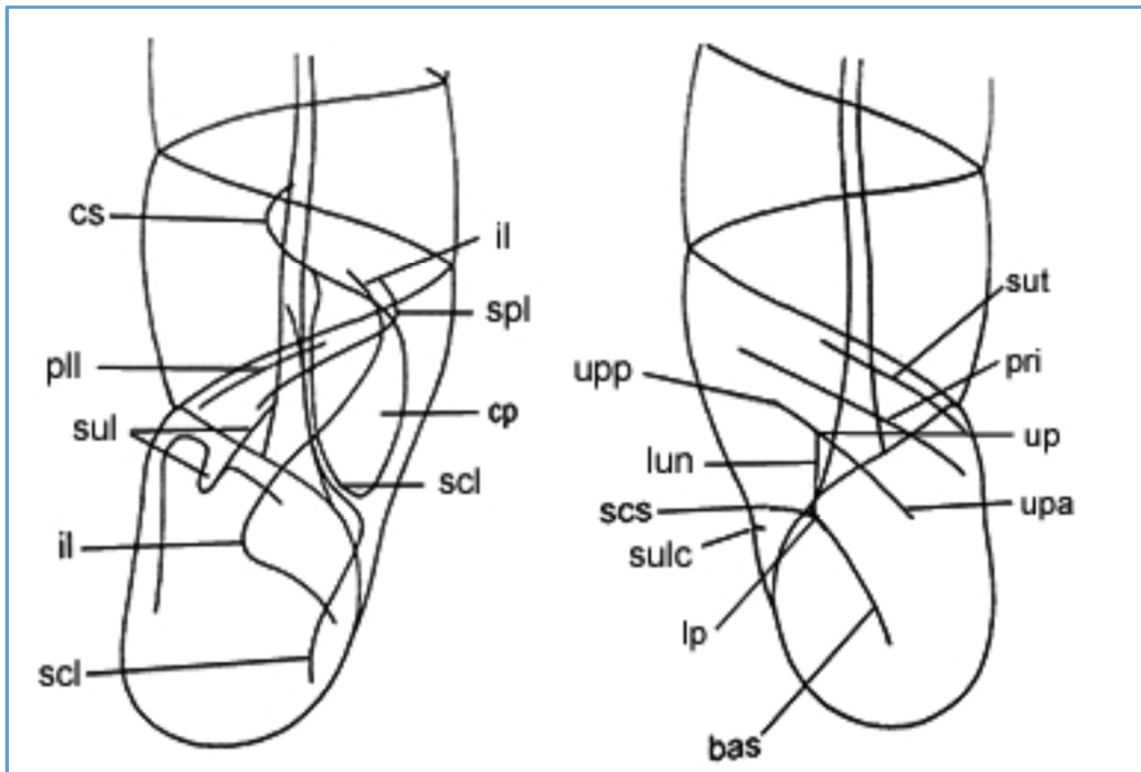


Figura 1. Ilustración esquemática del Aparato Clasulial (CA). Vista frontal “lamella” (izquierda) y vista dorsal “plicae” (derecha). Tomado de Irikov & Georgiev (2015).

Comparado a otras familias de caracoles terrestres, la familia Clausiliidae posee una distribución inusualmente grande (abarcando más de la mitad de la Tierra) y además extremadamente especiada a nivel local. Se estima que esta familia es conformada por aproximadamente 1300 especies que generalmente viven en rocas y cortezas de árboles. Se estima que el ancestro común más cercano de todos los Clausiliidae existentes data entre 54.9 y 108.6 millones de años (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

La familia Clausiliidae de caracoles terrestres tiene una distribución fragmentada en muchas partes del mundo (Figura 2). Con excepción de Australia y Norte América, Clausiliidae están presentes en prácticamente todas las áreas cuyos periodos de crecimiento de las plantas (condiciones adecuadas de lluvia y temperatura) consta de al menos 7 u 8 meses anuales. El Bosque Tropical Húmedo es una excepción importante ya que, por razones desconocidas, solo algunos pocos grupos especializados de Clausiliidae han colonizado sus áreas marginales, mientras que el área principal no ha sido colonizada en absoluto. Todos los 130 taxa descritos de Clausiliidae de Sudamérica pertenecen a la subfamilia Neniinae y Perú viene a ser el centro de diversificación, ya que 13 de sus 17 géneros descritos contienen solo especies endémicas, incluyendo al género *Andiniastra*. La mayoría de los taxa peruanos son de zonas de vegetación más secas. La distribución geográfica de caracteres anatómicos únicos que caracterizan grupos de géneros sugiere periodos largos de aislamiento, lo que contrasta con el patrón de dispersión múltiple de los linajes de Clausiliidae en Europa (Szekeres 1984). Actualmente se propone que el ancestro común más cercano de Clausiliidae evolucionó en Euroasia del oeste, con una característica apertura apostrófica, y que luego un linaje se desarrolló en Asia, resultando en Garnieriinae, y uno o dos linajes se convirtieron en Neniinae y Peruiniinae en el nuevo continente (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

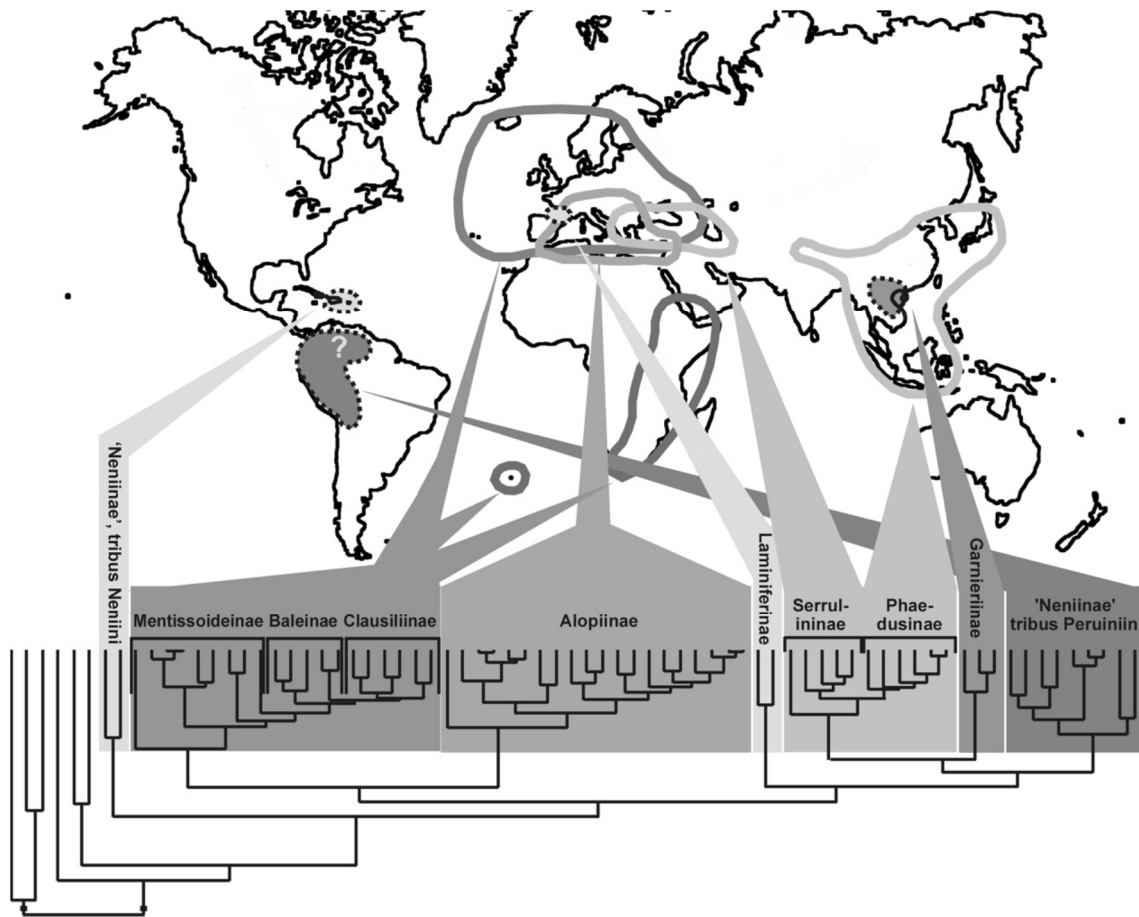


Figura 2. Distribución de los siete principales clados de la familia Clausiliidae, cada uno de ellos es ahora considerado una subfamilia (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

Hablando a nivel local, por la cantidad de investigaciones y expediciones hechas en el Perú, éste se ha convertido en un atractivo centro para estudios en Clausiliidae sudamericanos (Szekeres 1984). En la figura 3 podemos ver la distribución de los géneros de Clausiliidae peruanos en el territorio nacional.

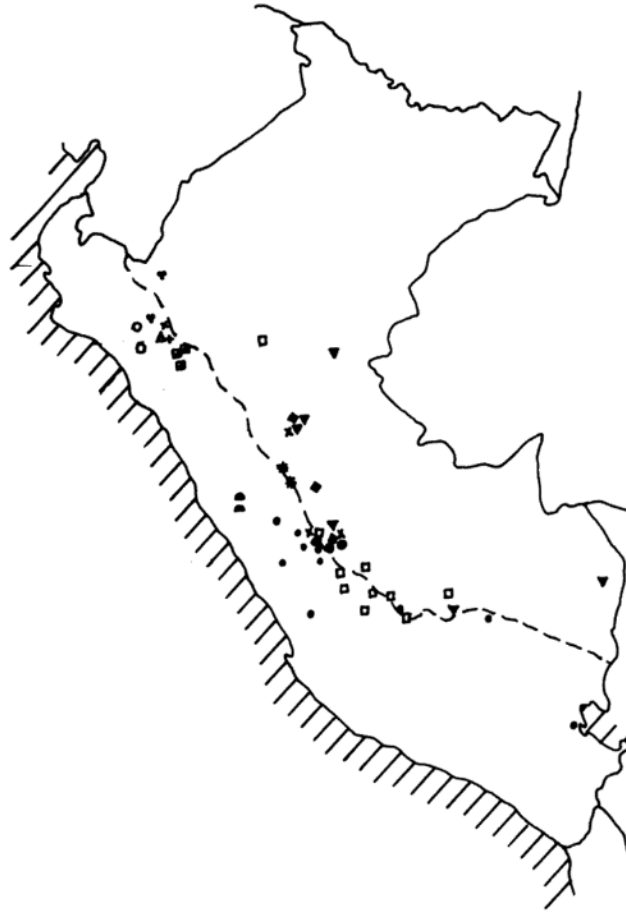


Figura 3. Distribución de los géneros de Clausiliidae en Perú (Szekeres 1984). La diversidad de géneros está indicada por la variedad de símbolos. Las áreas de bosque húmedo se encuentran al este de la línea no continua.

2.2 La Subfamilia Peruiniinae Nordisieck, 2005

En el año 2005, Hartmut Nordisieck hizo una reevaluación de los Neniinae peruanos (Gastrópoda) donde basados en la evidencia morfológica de las conchas de estos caracoles, atribuyó todos sus géneros a la nueva tribu Peruiniini y además también afilió a los otros géneros de Sudamérica. Se escogió a *Peruinia* como género tipo de esta tribu ya que el autor tenía conocimiento por examinación personal de la anatomía de la genitalia. Actualmente la tribu Peruiniini ha sido elevada a la categoría de subfamilia luego de una revisión

usando datos moleculares y ahora se le conoce como Peruiniinae, además la forma en la que los Clausiliidae llegaron al nuevo continente, y en especial a Sudamérica, es aún materia de discusión, pero se alega que ocurrió en algún momento del Cenozoico temprano, al menos desde hace 40.7 millones de años (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

2.2.1 *Andiniastra violascens* Nordsieck, 2005

Se describió una sola especie para el nuevo género *Andiniastra* basado únicamente en caracteres ligados a su concha, lo que fue posible ya que según cita el autor “Los caracteres de las conchas de los Clausilidos son, por regla, suficiente para la clasificación del género de las respectivas especies” (Nordsieck 2005). Los caracteres usados fueron el “degollamiento de la concha” (“Decollation”), “ornamentación de la concha”, “vuelta corporal” (“Body Whorl”), “visibilidad de la apostrofe” (“Apostrophy”), “relación de la lamela superior” (“upper lamellae”), “relación de la lamela subcolumelar y lúnula”, y “desarrollo de la plica palatina inferior posterior”. Se describió entonces a *Andiniastra violascens* (bautizado así por el color de la concha) como especie tipo de ese nuevo género acotando que es similar al género *Andinia*, que es encontrado en el valle del río Llaucán al este del río Marañón, al cual fue afiliado en un primer lugar y del cual se diferencia principalmente por presentar una concha menos degollada y una ornamentación simple en su superficie (Nordsieck 2005).

El holotipo (SMF 328068) fue colectado en el departamento de Amazonas en el kilómetro 35 de la carretera de Chachapoyas hacia Pedro Ruiz (06°03.706' S 77°55.042' W) el 28 de marzo del 2004 por J. Hemmen y depositado en el Museo Senckenberg de Historia Natural de Alemania.

No existen investigaciones posteriores o menciones del género *Andiniastra* ya sea a nivel anatómico o molecular, por ejemplo, en la figura 4 podemos observar el clado sudamericano de la filogenia de la familia Clausiliidae (Uit de Weerd & Gittenberger 2013), en ella no se usan datos moleculares del género *Andiniastra* y además hasta la fecha no existen registros de secuencias de ADN de ese género en la base de datos NCBI. Otra cosa interesante acerca de esta filogenia es que se pone a disposición datos de los marcadores 28S rRNA, H3 y H4 de un espécimen de *Andinia taczanowskii* perteneciente al que viene a ser el género tipo de la Tribu Peruiniini (Nordsieck 2005) que fue colectado en Perú.

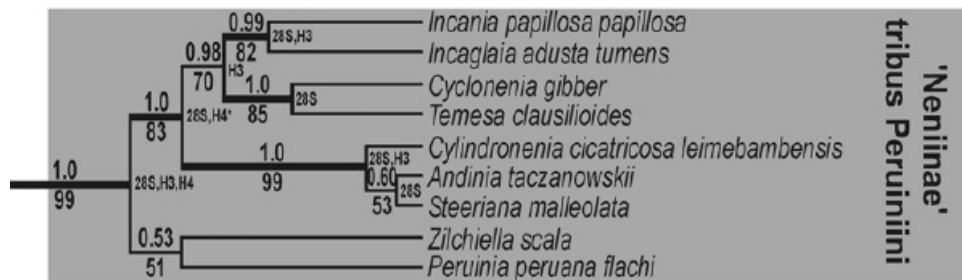


Figura 4. Extracto de la filogenia de la familia Clausiliidae (Uit de Weerd & Gittenberger 2013) mostrando las especies utilizadas de la tribu Peruiniini (Clausiliidae Sudamericanos).

2.2.2 *Cylindronenia cicatricosa leimebambensis* Nordsieck, 1999

Descrita en el año 1999 por Nordsieck por métodos morfológicos, posteriormente fue incluida en la filogenia molecular mundial de Clausiliidae (Uit de Weed & Gittenberger 2013). El holotipo (NNM 59391) fue colectado encima y bajo las rocas en Leymebamba, departamento de Amazonas, Perú. Este difiere de la subespecie nominal principalmente por una conchilla más fusiforme con menos vueltas, costillas más estrechamente espaciadas y el lunelar menos profundamente situado (Nordsieck, 1999). Medidas del holotipo: Altura: 21.2 mm, Ancho: 5.7 mm, vueltas: 5 y $\frac{3}{4}$. Altura de los paratipos (n=5): 20.0 – 23.5 mm.



Figura 5. 1 – 2 *C. cicatricosa cicatricosa* (Loosjes & Loosjes-van Bemmelen, 1989).
3 – 4 *C. cicatricosa leimebambensis* Nordsieck, 1999. Modificado de Nordsieck, 1999.

2.2.3 *Symptychiella* Nordsieck, 1999

El género fue descrito por Nordsieck (1999) a partir de algunas muestras de conchillas provenientes del Museo de Historia Natural de San Marcos (MUSM) que fueron enviadas al Dr. Loosjes para su identificación y depositadas en su colección en el Museo Nacional de Historia Natural (NNM) de los Países Bajos. Se describió entonces a la especie *S. annae* como el único Clausiliidae de Sudamérica con una apertura no apostrófica por lo que no se le consideró como parte de la entonces subfamilia Neniinae. Además era la única especie con una sola lamella en vez de una superior e inferior y con el aparato clausilial tipo G especial. Actualmente el género *Symptychiella* es caracterizado por un aparato de cierre especial parecido al aparato clausilial tipo G de los Clausiliidae europeos pero con diferencias esenciales (Nordsieck 2005). La mayoría de las especies de *Symptychiella* han sido descritas entre la provincia de Rioja y Moyobamba en el departamento de San Martín, y solo unas pocas han sido descritas en Amazonas cerca a Chachapoyas, además la mayoría mide entre 15 y 25 mm.

A continuación se presenta una lista de especies y subespecies de *Symptychiella* descritas hasta el momento, la ubicación de muchas de ellas se puede observar en la figura 6. Cabe destacar que no se han reportado estudios realizados con marcadores moleculares y que lo presentado en este trabajo es información inédita de este tipo para este género.

- ***Symptychiella (Symptychiella):***

Symptychiella (S.) annae Nordsieck, 1999 – Amazonas

Symptychiella (S.) bilamellata Nordsieck, 2005 – San Martin

S (S.) bilamellata laevigata Nordsieck, 2010 – San Martin

S (S.) bilamellata costulata Nordsieck, 2010 – San Martin

S (S.) bilamellata fratermajor Nordsieck, 2010 – San Martin

Symptychiella (S.) fratermajor Nordsieck, 2010 – San Martin

Symptychiella (S.) acuminata Nordsieck, 2010 – San Martin

- ***Symptychiella (Divanenia) Nordsieck, 2005:***

Symptychiella (D.) christae Nordsieck, 2007 – San Martin

Symptychiella (D.) elegantissima Nordsieck, 2005 – San Martin

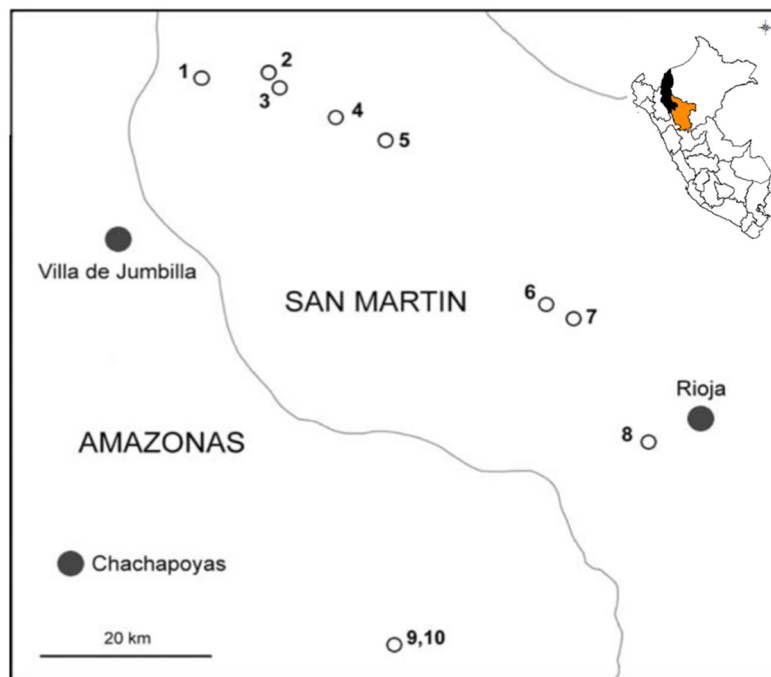


Figura 6. Distribución de algunas especies y subespecies de *Symptychiella*.
Extraído del Mapa 2 de Nordsieck (2010) – *S. bilamellata costulata* (1, 2 y 3), *S. b. laevigata* (4), *S. fratermajor* (4), *S. christae* (5), *S. b. bilamellata* (6), *S. elegantissima* (6), *S. acuminata* (7), *S. b. gracilicosta* (8), *S. annae* (9 y 10)

2.3 Marcadores Moleculares: *COI*, *16S rRNA* y *28S rRNA*

2.3.1 Marcadores moleculares mitocondriales: *COI* & *16S rRNA*

Dentro de este marco, la identificación de especies vía secuencias de ADN es la base de la sistemática molecular y el código de barras de ADN (Hebert *et al.* 2003). Actualmente existe una fuerte tendencia al uso de marcadores mitocondriales para este propósito, en particular a un fragmento del gen Citocromo C oxidasa subunidad I (*COI*). Se espera generalmente que los marcadores mitocondriales puedan proporcionar una óptima resolución a nivel de especie porque su herencia materna da como resultado un tamaño de población efectivo más pequeño y por lo tanto una fijación más rápida de mutaciones neutrales (Sonnenberg *et al.* 2007). A menudo al marcador mitocondrial *COI* se le ha agregado información del marcador de *16S rRNA* para poder resolver las relaciones entre poblaciones de especies de caracoles terrestres (Mahmoud & Busais 2012) encontrando que el marcador *COI*, siendo un marcador codificante, normalmente evoluciona más rápido que *16S rRNA* pero sin deleciones o inserciones, además el marcador *16S rRNA* es más útil para resolver las filogenias a nivel basal (Elejalde *et al.* 2008).

El DNA mitocondrial animal típico tiene una alta tasa de mutación y una economía organizacional excepcional. La alta tasa evolutiva del ADNmt animal implica que se podrían observar cantidades significativas de variación de secuencia en especies estrechamente relacionadas, una característica útil para los procedimientos de identificación de especies (Li *et al.* 2014), sin embargo, los marcadores mitocondriales no siempre reflejan la historia completa de una especie (Sonnenberg *et al.* 2007). Por lo tanto, el uso de múltiples loci, tanto de

origen mitocondrial como nuclear, se ha vuelto conveniente para asegurar la detección de patrones derivados de procesos verdaderos a nivel de población y no solo de la historia específica de loci (Arbeláez-Cortés *et al.* 2014).

2.3.2 Marcador molecular nuclear: 28S rRNA

Por regla general, los marcadores nucleares presentan menos variación molecular que los marcadores mitocondriales, debido a eso, son usados en estudios de filogenias de categorías más divergentes y que cubren una mayor cantidad de taxa. Es comunmente usado para reconstruir filogenias profundas en los moluscos, algunos ejemplos son la filogenia de gastrópodos realizada por Wade & Mordan (2000) y la filogenia de bivalvos heterodontos (Taylor *et al.* 2007)

En cuanto a la secuencia de 28S rRNA (LSU) se sabe que posee una región diversa en el extremo 5 '(D1 / D2), que sugiere que es útil como región de diagnóstico para la identificación a nivel específico (Hirai *et al.* 2013).

2.4 Empleo de marcadores moleculares en la Sistemática Molecular y Filogeografía de Clausiliidae

El uso de marcadores moleculares de ADN nos ofrece múltiples ventajas en cuanto a investigación de la biodiversidad, por ejemplo, el estudio de las variaciones geográficas de los caracteres dentro de una especie nos brinda una mirada a su historia reciente, los detalles son luego desvelados cuando los análisis filogenéticos de las secuencias de ADN son examinados en un marco de referencia geográfico (como en el caso de la Filogeografía) (Arbeláez-Cortés *et al.* 2014). Además, la comparación de patrones filogeográficos entre especies nos brinda información valiosa y una mejor idea acerca de los procesos que dirigieron la divergencia de una población en una región, de tal manera que

especies que comparten áreas de distribución deberían haber sido influenciadas por procesos históricos similares, dando lugar a patrones filogeográficos concordantes (Avice 2000). De esta forma el uso de marcadores moleculares de ADN nos ayuda a complementar la información que se tiene sobre las especies que comprenden nuestros ecosistemas y así entender los procesos de especiación, la situación poblacional, sus relaciones evolutivas con otras especies cercanas y encontrar el posible origen evolutivo de los taxa.

2.4.1 Código de Barras de ADN

Como cualquier otro tipo de información molecular, los códigos de barras de ADN generan información mas no conocimiento (Schindel & Miller 2005), es menester del investigador usar esta información de manera responsable para generar conocimiento disponible para ser usado de diferentes formas útiles. Los códigos de barras de ADN son tanto una herramienta útil para los taxónomos, como un sistema de buen costo-beneficio para que las personas no especialistas, tales como inspectores de fronteras, puedan asignar especímenes no identificados a una especie conocida (Schindel & Miller 2005). Los códigos de barras de ADN sirven principalmente a dos objetivos: La identificación de especímenes y el descubrimiento de nuevas especies. La identificación de especímenes, útil sobre todo cuando los caracteres morfológicos están dañados (de manera parcial o total) o son engañosos (como en las especies con dimorfismo sexual), implica asignar una posición taxonómica a un espécimen desconocido usando una biblioteca de referencia de códigos de barras de ADN de especímenes voucher previamente identificados morfológicamente por expertos en el tema. Entre tanto, el descubrimiento de especies mediante códigos de barras de ADN está pensado como una herramienta poderosa de triaje para una primera medición

de la biodiversidad, separando de manera rápida lo colectado en unidades parecidas a especies a las que luego se les podrán realizar estudios más sofisticados de delimitación de especies (Collins & Cruickshank 2012).

El Sistema de Datos de Códigos de Barras (BOLD) es la plataforma de trabajo virtual más usada para estos propósitos ya que ayuda a la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de códigos de barras, además que posee una interfaz muy sencilla de entender (Ratnasingham & Hebert 2007). Se han estandarizado los marcadores por grupo taxonómico, en gastrópodos se utiliza CO1 como marcador principal y 16S rRNA como secundario (figura 7). Hasta el momento de producción de este trabajo, en BOLD System se encontraba depositado un total de 829 secuencias de CO1 provenientes de 133 especies de Clausiliidae provenientes de 12 países, las cuales forman un total de 322 grupos (BINs). Los géneros *Montenegrina*, *Albinaria* y *Stereophaedusa* aportan casi la mitad de las secuencias depositadas. No se encontraron registros de Clausiliidae de América en esta plataforma.

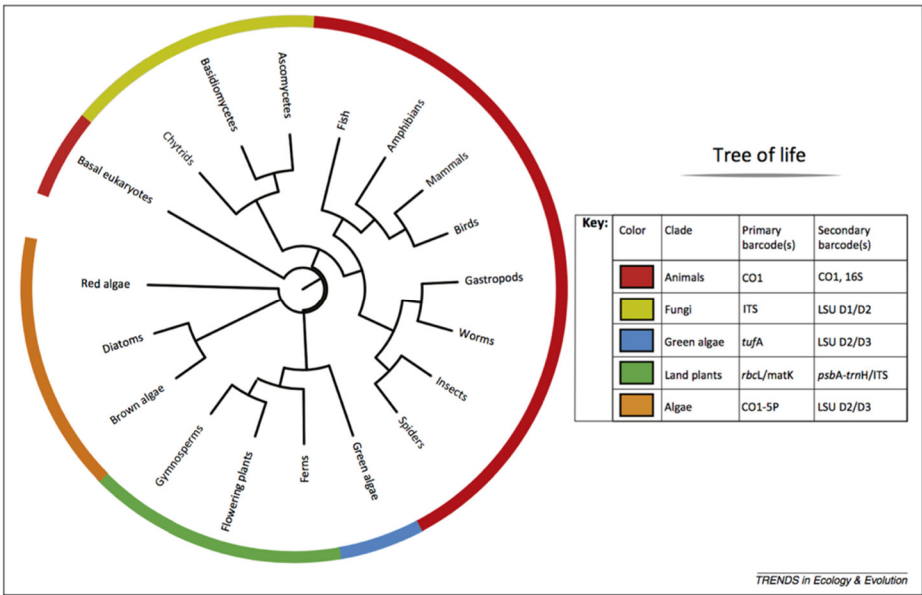


Figura 7. Árbol de la vida y los marcadores moleculares estandarizados para cada grupo (Kress *et al.* 2014)

2.4.2 Datos moleculares y claves taxonómicas

Existen muchos otros ejemplos sobre la utilidad de contrastar los caracteres morfológicos clásicos con los moleculares en la familia Clausiliidae, por ejemplo existen investigaciones que han revisado los caracteres del tipo N o G del aparato clausilial (Van Moorsel *et al.* 2000; Nordsieck 1979), caracteres del aparato reproductor (Hirano *et al.* 2014), tipo de simetría (Fehér *et al.* 2013) y forma de la apertura (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

Simetría dextral y Siniestral

La familia Clausiliidae, al contrario de lo observado en la gran mayoría de gasterópodos, posee simetría siniestral, característica rigurosamente presentada en la mayoría de sus subfamilias menos en *Alopiinae* donde algunos de sus géneros presentan especies con simetría dextral. El análisis de la filogenia molecular del género *Alopi*, inferida usando COI (Figura 8), ha revelado múltiples e independientes inversiones en la historia evolutiva de esta subfamilia, es decir, que los taxa dextrales de *Alopi* no son monofiléticos (Fehér *et al.* 2013)

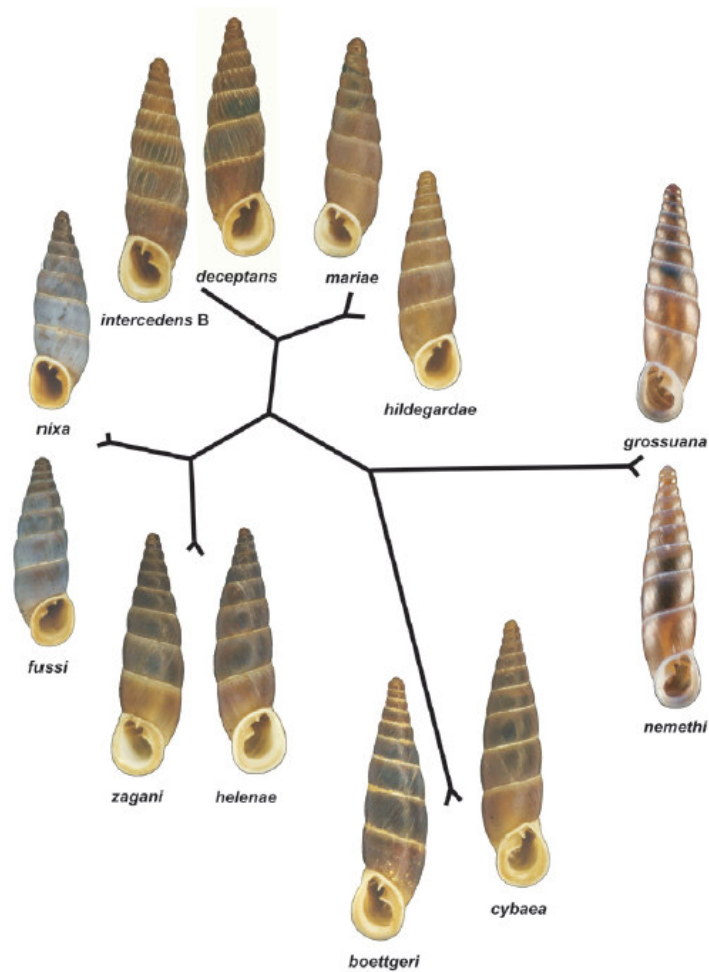


Figura 8. Relaciones filogenéticas basadas en COI contrastado con la morfología de la conchilla de *Alopia*. Se puede observar la ocurrencia paralela en diferentes clados de esta subfamilia (Fehér *et al.* 2013)

Forma de la Apertura

La forma de la apertura es uno de los caracteres morfológicos de la conchilla que es más informativo a nivel de subfamilia, de hecho es el más informativo a nivel de subfamilia de entre cinco caracteres examinados en un estudio que contrastaba este tipo de información con marcadores moleculares (Uit de Weerd & Gittenberger, 2013). La forma de la apertura puede ser no-apostrófica (Figura 9 - A), semi-apostrófica (Figura 9 – B) o apostrófica (Figura 9 - C), que se relaciona a su similitud morfológica con el signo ortográfico llamado

“apóstrofo”, en el mismo análisis se llegó a la conclusión de que la forma no-apostrófica es una condición apomórfica para los Clausiliidae del neotrópico.

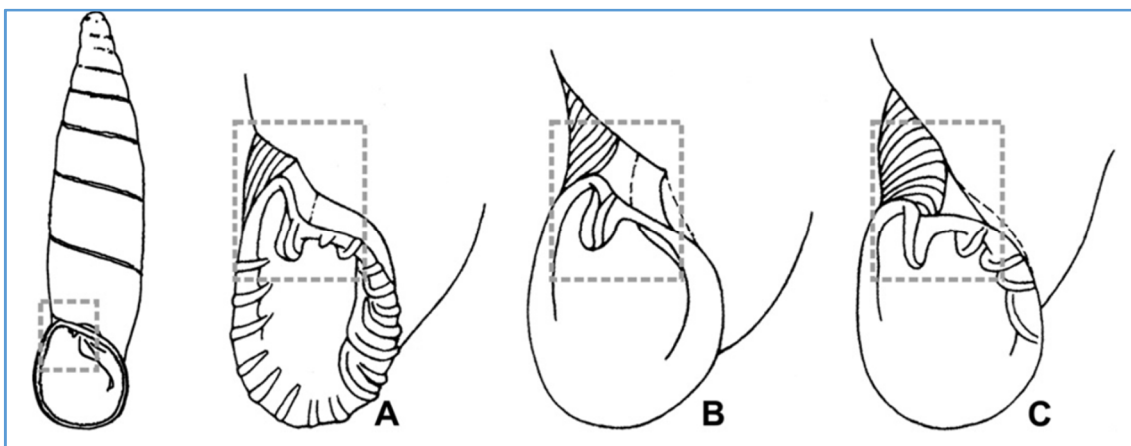


Figura 9. Conchilla de Clausiliidae con apertura no apostrófica (A), semi-apostrófica (B) y apostrófica (C) respectivamente (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

2.4.3 Filogenia molecular mundial de Clausiliidae

En el año 2013, se reunió información de secuencias de ADN nuclear (H3, H4 y 28S rRNA) de todas las subfamilias de Clausiliidae para realizar una primera reconstrucción filogenética de nivel mundial de este grupo, demostrando que el uso de este set de marcadores mitocondriales y nucleares muestra suficiente resolución para llevar a cabo una reconstrucción filogenética de ese nivel (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

Uno de los resultados más interesantes que se obtuvieron al realizar por primera vez la filogenia mundial de Clausiliidae es que todos los caracteres morfológicos de la conchilla de caracol usados en la clasificación clásica de Clausiliidae presentaron homoplasia a nivel de subfamilia, lo que nos insta a reevaluar la caracterización de especies que fueron descritas únicamente usando caracteres

morfológicos como lo es en el caso de *Andiniastra violascens* (Uit de Weerd & Gittenberger 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Resolver la posición evolutiva de *Andiniastra violascens* dentro de la familia Clausiliidae.

3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar los protocolos para la obtención de las secuencias de ADN de los marcadores moleculares COI, 16S rRNA, 28S rRNA de *Andiniastra violascens*.
- Obtención del código de barras de ADN de los especímenes de la localidad tipo de *Andiniastra violascens*.
- Caracterizar la diversidad intraespecífica de *Andiniastra violascens* en las poblaciones encontradas.
- Análisis de las relaciones evolutivas de *Andiniastra violascens* con otros Clausiliidae peruanos utilizando marcadores de ADN nucleares (28S rRNA) y mitocondriales (COI y 16S rRNA)

4. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

La especie *Andiniastra violascens* es lejana evolutivamente a las especies del género *Andinia* que pertenecen a la subfamilia Peruiniinae de la familia Clausiliidae.

Hipótesis alternativa

La especie *Andiniastra violascens* es más cercana evolutivamente a las especies del género *Andinia* que pertenecen a la subfamilia Peruiniinae de la familia Clausiliidae.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Zonas de muestreo

Los especímenes de Clausiliidae peruanos, incluyendo los de *Andiniastra violascens* de la localidad tipo y de otras localidades, fueron colectados dentro de los viajes realizados con el financiamiento CON-CON del Vicerrectorado de Investigaciones y del Rectorado en los proyectos de investigación del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a cargo de la Dra. Rina Ramírez. La colecta de especímenes de los Clausiliidae analizados en este estudio se llevó a cabo en diferentes puntos de los departamentos de Amazonas, Cajamarca y San Martín. El muestreo de *Andiniastra violascens* se realizó en puntos cercanos al río Uctubamba y los ejemplares vivos se colectaron cerca al desvío de la carretera hacia la localidad de Cocachimba en la provincia de Bongará en el departamento de Amazonas, la distancia entre nuestro punto de muestreo y el del holotipo original fue de solo 500 metros, y a toda esta zona la conocemos entonces como la Localidad Tipo (Figura 10). También se colectaron conchillas a unos 5 km yendo por la autopista desde la localidad tipo hacia Chachapoyas, los puntos de muestreo y hallazgos se encuentran señalados en la Figura 11. Se colectaron especímenes de *Andiniastra* que mostraban diferencias que fueron luego analizadas, por lo que se le denominó como *Andiniastra aff. violascens*, estas muestras se obtuvieron en los alrededores de Santo Tomás en la provincia de Cutervo, departamento de Cajamarca (Figura 12). Las muestras vivas de *Cylindronenia cicatricosa leimebambensis* fueron obtenidas en Leymebamba en la provincia de Chachapoyas, departamento de

Amazonas (Figura 13), mientras que especímenes de *Symptychiella sp.* fueron colectados en Juan Guerra en la provincia de Lamas, departamento de San Martín (Figura 14). Las coordenadas tomadas en los puntos de muestreos están indicadas en la tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas de muestreo en este estudio. Las colectas se realizaron en los puntos señalados y sus alrededores mediante caminatas de varios kilómetros a pie.

Especie	Coordenadas / Altitud	Descripción
<i>Andiniastra violascens</i>	06°03'37.00" S 77°55'18.10" W 1433 msnm	Localidad Tipo, Provincia de Bongará, Departamento de Amazonas
<i>Andiniastra aff. violascens</i>	06°09'27.00" S 78°41'05.50" W 2076 msnm	Santo Tomás, Provincia de Cutervo, Departamento de Amazonas
<i>Cylindronenia cicatricosa leimebambensis</i>	06°43'35.00" S 77°48'05.00" W 2465 msnm	Leymebamba, Provincia de Chachapoyas, Departamento de Amazonas
<i>Symptychiella sp.</i>	06°37'17.00" S 76°22'54.50" W 223 msnm	Juan Guerra, Provincia de Lamas, Departamento de San Martín

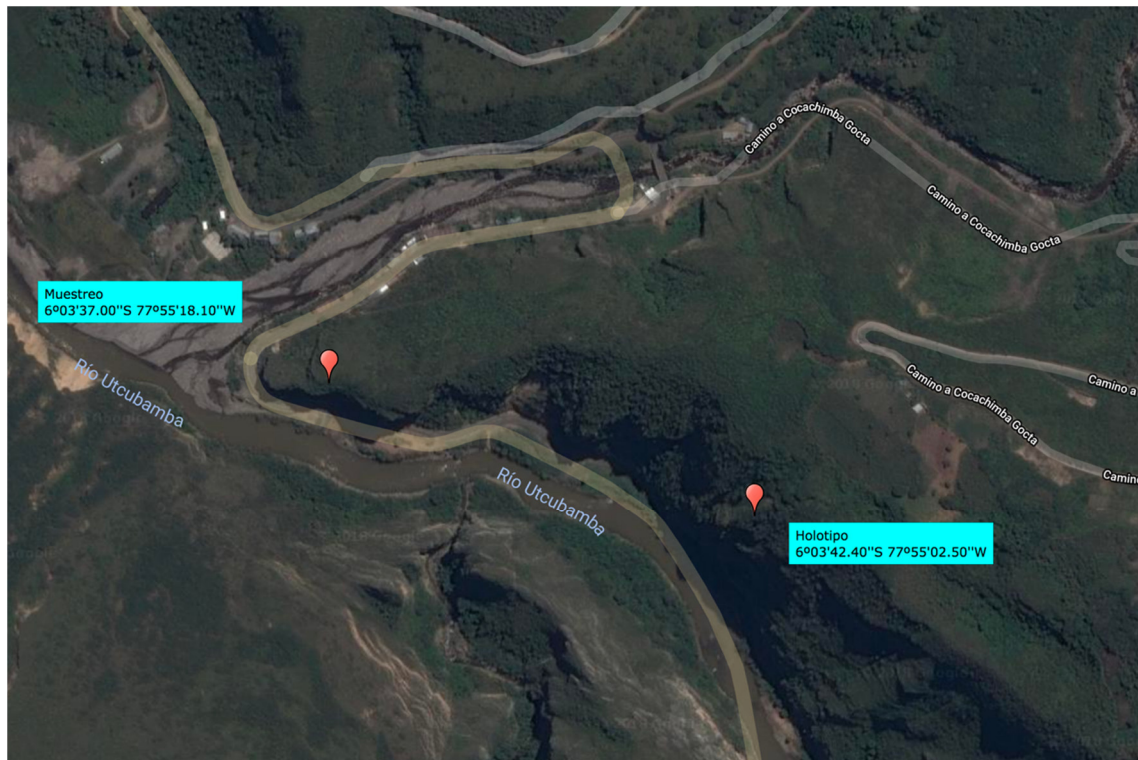


Figura 10. Zona de muestreo de *Andiniastra violascens*. Origen del holotipo SMF 328068 (puntero rojo inferior) y punto de muestreo en este estudio (puntero rojo superior). Ambos puntos separados por alrededor de 500 metros.

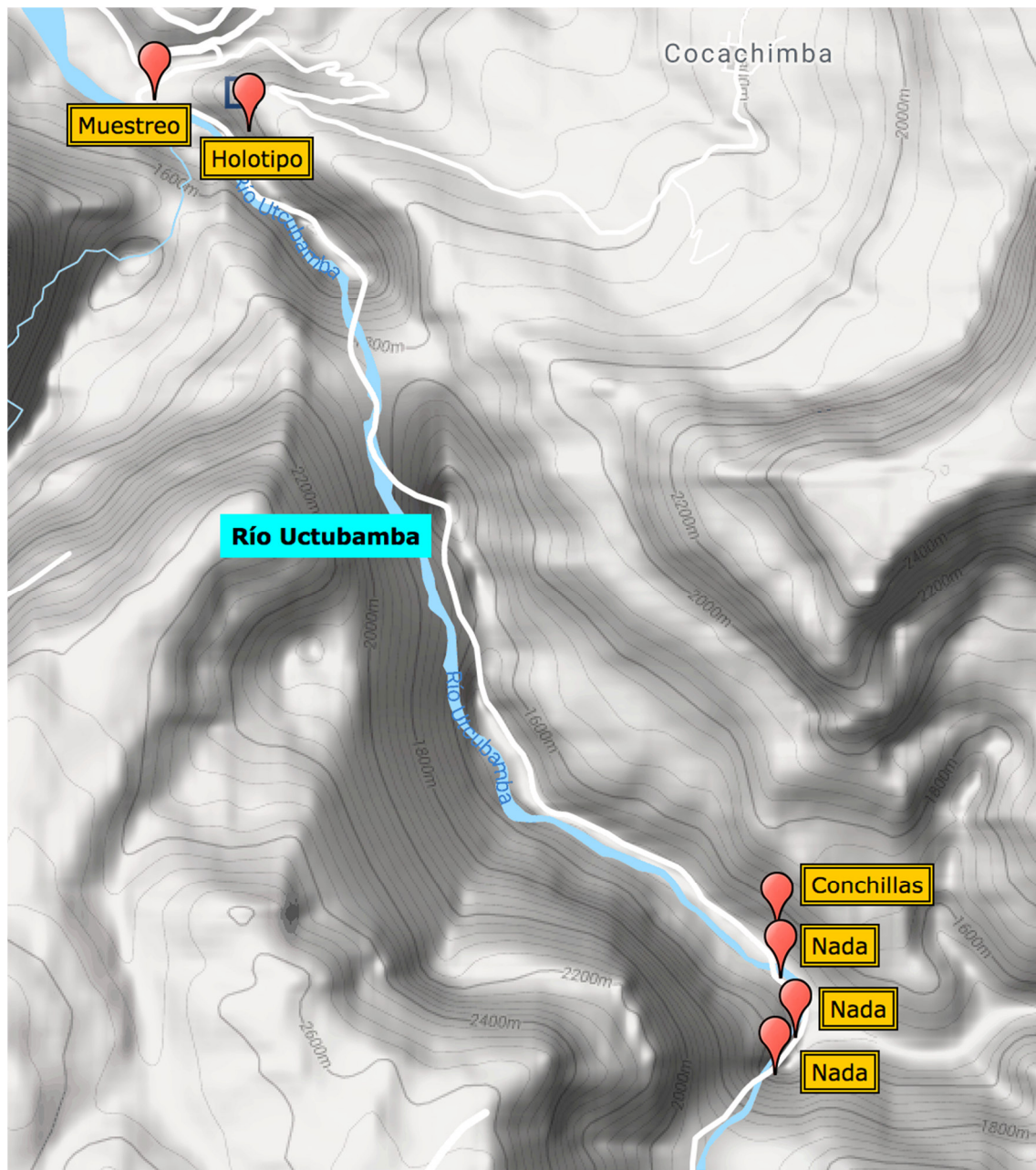


Figura 11. Puntos de muestreo. En el recuadro amarillo se muestra lo que se encontró en cada punto, también se señala el punto de recolección del holotipo original de Nordsieck 2005. La distancia entre el muestreo de organismos vivos y el de conchillas es de aproximadamente 5 km.



Figura 12. Zona de muestreo de *Andiniastra aff. violascens*. Se realizó en los alrededores de la localidad de Santo Tomás (resaltado), provincia de Cutervo – Cajamarca, se muestra su cercanía al río Marañón. Las líneas punteadas indican la frontera entre Amazonas y Cajamarca. En la esquina inferior derecha se ofrece una escala de 3 km.



Figura 13. Zona de muestreo de *Cylindronenia cicatricosa leimebambensis*. distrito de Leimebamba, provincia de Chachapoyas – Amazonas (Puntero rojo), cerca al río Marañón. Las zonas punteadas indican las fronteras Cajamarca – Amazonas (izquierda) y Amazonas - San Martín (derecha).

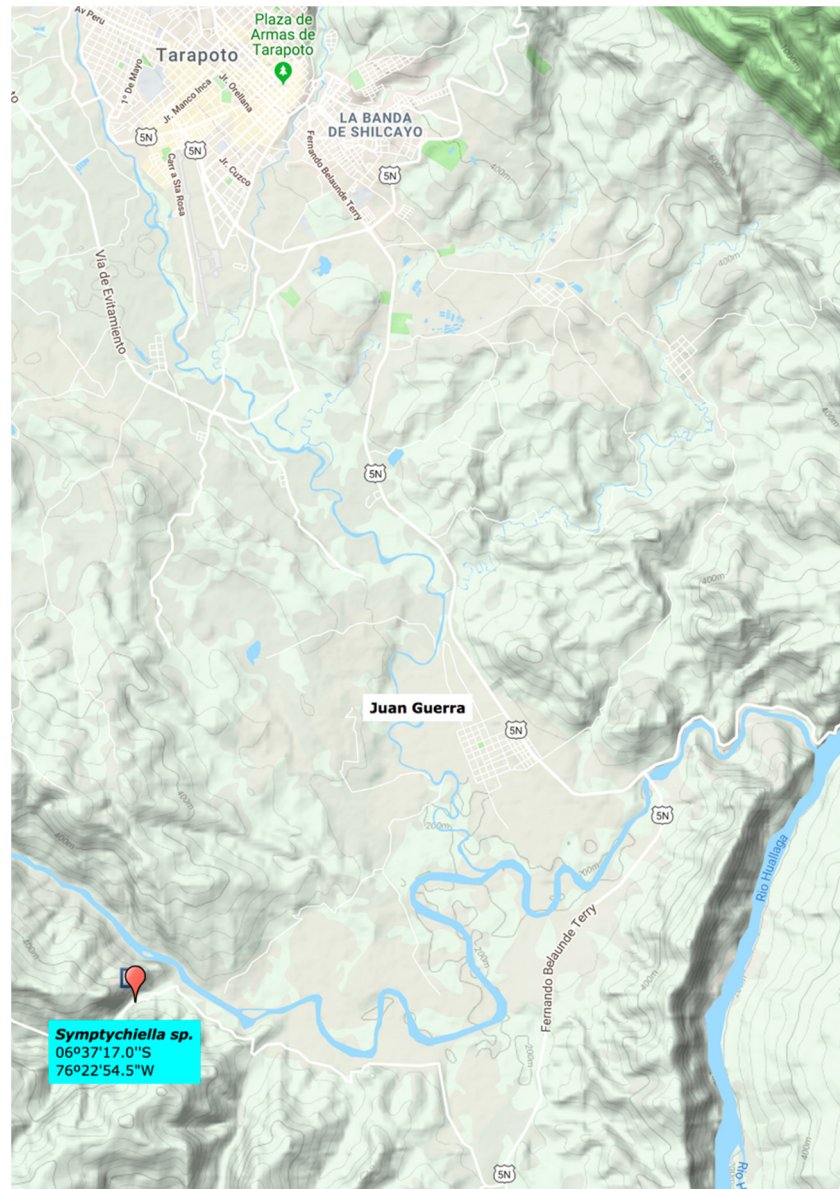


Figura 14. Zona de muestreo de *Symptychiella sp.* Cerca de Juan Guerra, provincia de Lamas – San Martín. Cerca al río Huallaga.

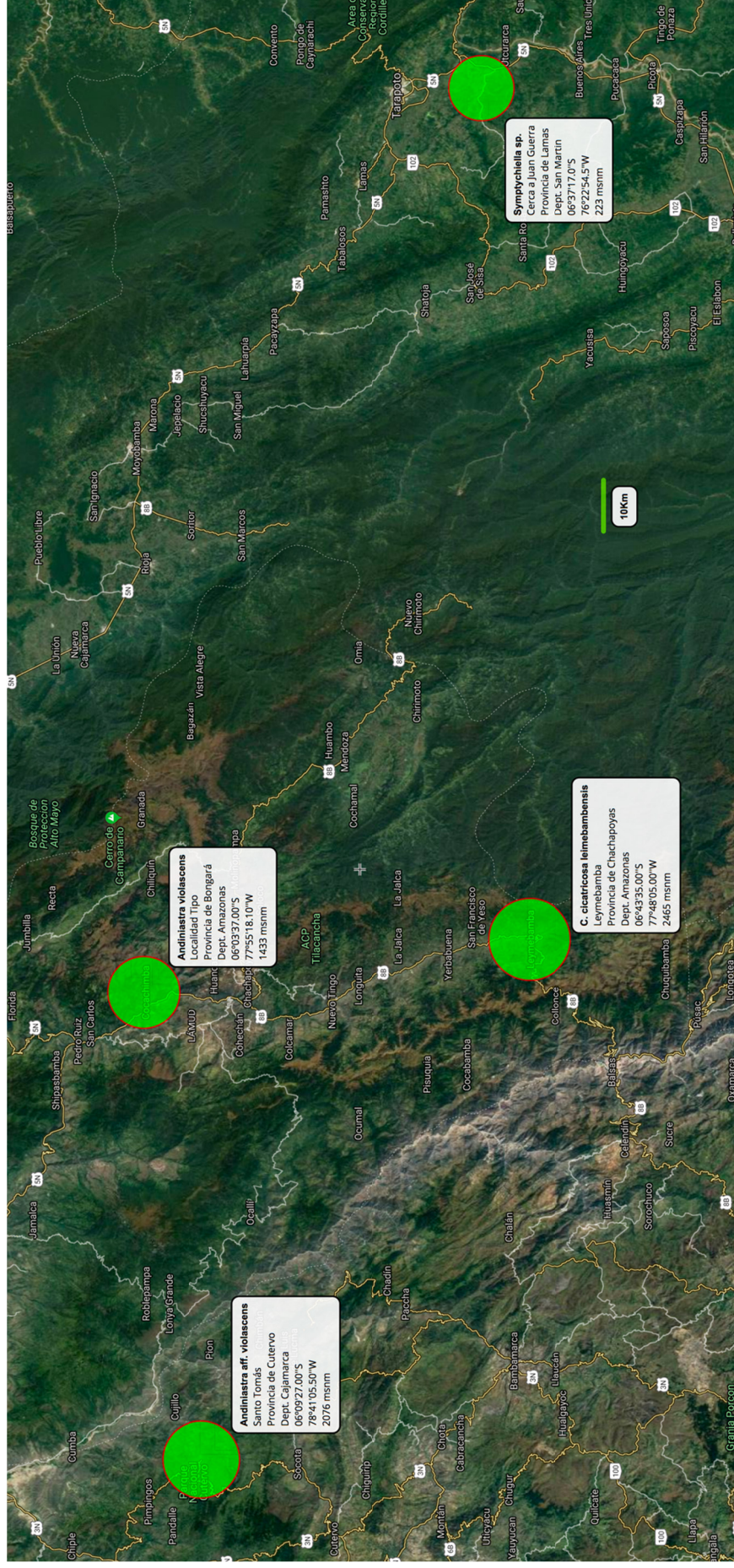


Figura 15. Vista general de las zonas de muestreo con coordenadas. Departamentos de Cajamarca, Amazonas y San Martin (de izquierda a derecha).



Figura 16. Fotografías de la Localidad Tipo de *Andiniastra violascens* en la provincia de Bongará, Amazonas. Paredones y vegetación junto a la carretera Chachapoyas – Pedro Ruiz Gallo y al río Uctubamba.



Figura 17. (A) El río Marañón y los departamentos de Amazonas (margen derecha) y Cajamarca (margen izquierda). (B) Fotografía tomada desde Malleta (Cajamarca), punto cercano a Santo Tomás (Cajamarca).

5.2 Documentación y preparación de las muestras biológicas para extracción de ADN

El material biológico fue obtenido en colaboración con la Dra. Rina Ramírez y la colecta se realizó de manera directa. Generalmente los individuos se encuentran en relación a grandes rocas, ocultándose entre ellas en las épocas secas para conservar la humedad. Cada individuo fue caracterizado *in situ* con la ayuda de un experto por lo menos hasta el nivel de familia, luego fueron clasificados hasta el nivel de especie en el laboratorio con ayuda de claves taxonómicas. Se anotaron las coordenadas exactas del lugar de cada colecta, así como sus datos y características. También se anotó la fecha y los colectores. Se realizaron tomas fotográficas de los individuos en su ambiente natural y también tomas individuales sobre papel milimetrado con sus etiquetas en el laboratorio. Se cortó y se separó una porción de músculo del pie de los caracoles para la extracción de ADN y se preservaron los individuos en alcohol de 96°, de estas muestras musculares algunas se extrajeron de inmediato mientras que otras fueron preservadas en alcohol de 96° y almacenados a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN asegurando una mejor preservación del material genético. Se usaron muestras de 1 mm³ de músculo del pie del caracol, tratando de remover el epitelio y picando las muestras en fracciones más pequeñas con la ayuda de una cuchilla estéril, si las muestras se encontraban preservadas en etanol de 96°, éstas se rehidrataban en agua destilada para remover los residuos de alcohol que pudieran contener, el procedimiento en estos casos fue el de colocar la muestra picada en un tubo de 1.5 ml y llenarlo de agua destilada hasta 1 o 1.2 ml, revolver vigorosamente por 30 segundos, centrifugar a 10 000 rpm durante 40 segundos, decantar el agua y ayudarnos de papel toalla limpio o pipetas para

remover la mayor cantidad de líquido posible, luego de este procedimiento la muestra está preparada para su extracción de ADN genómico.

Tabla 2. Codificación de los especímenes usados en este estudio

Especie	Códigos de Extracción
<i>Andiniastra violascens</i>	O98 O99 O100 R1 R2 T21 T22 T23 T24
<i>Andiniastra aff. violascens</i>	O67 O68 O69 O70 O71 O72 T11 T12 T13 T14
<i>C. cicatricosa leimebambensis</i>	O93 O94 O95 O96 O97 T25 T26 T27 T28
<i>Symptychiella sp.</i>	S75 S76 S77 S78

5.3 Fotografías y tomas de Rayos X

Se seleccionó una conchilla por especie endémica estudiada, las cuales fueron medidas y fotografiadas por el autor en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía usando un estereoscopio Euromex (Figuras 18, 20 y 21) y una cámara canon it5 (Figura 19). También se tomaron placas de rayos X de las conchillas de *Andiniastra* provenientes de Amazonas y Cajamarca en el Consultorio Dental de la Dra. Maria Huamaní Ruiz mediante una máquina de rayos X digital ORIX 70, usando tiempos de exposición de 35 o 40 segundos.



Figura 18. *Andiniastra violascens* (Altura = 22 mm). AMAZONAS

Fotografía por Jaime Morín.



Figura 19. *Andiniastra* aff. *violascens* (Altura = 32 mm). CAJAMARCA

Fotografía por Jaime Morín.



Figura 20. *Cylindronenia cicatricosa leimebambensis* (Altura = 22 mm).
AMAZONAS. Fotografía por Jaime Morín.



Figura 21. *Symptychiella* sp. (Altura = 16 mm). SAN MARTIN.

Fotografía por Jaime Morín.

5.4 Extracción y Cuantificación de ADN genómico

Todos los procedimientos moleculares se realizaron en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La extracción de ADN genómico (**ADNg**) se realizó mediante el **Kit de Extracción de ADN de Moluscos de Quiagen** siguiendo los protocolos especificados por el fabricante. Al finalizar la extracción de ADN, se realizó la cuantificación molecular mediante un Nanodrop Lite de *Thermo Scientific* y se anotaron los valores de concentración de ADN ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$) y la relación 260nm/280nm (pureza) como principales indicadores de la calidad del procedimiento. Idealmente las extracciones de ADN genómico deben tener una concentración estándar de entre 20 y 50 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$, y en los casos donde lo extraído superó ese valor, se realizaron diluciones en un nuevo tubo utilizando un volumen adecuado de lo extraído y de buffer de elusión (incluido en el Kit de extracción). Los valores de la relación 260nm/280nm (pureza) deberán estar próximos a 2.0 para considerar que lo extraído no contiene impurezas que puedan degradar el ADN genómico o impedir la reacción de PCR.

5.5 Amplificación de secuencias de ADN por PCR

Para los estudios de variación intraespecífica se utilizan los marcadores mitocondriales citocromo oxidasa C subunidad I (COI) y ARN ribosomal 16S, además la secuencia de COI nos sirve para la caracterización molecular u obtención de códigos de barras de la especie. Para los estudios filogenéticos se utilizó un fragmento del gen 28S rRNA como marcador molecular. La amplificación de las secuencias de COI se realizó utilizando los cebadores

universales LCO 1490 y HCO 2198 descritos por Folmer *et al.* (1994) los cuales amplifican un aproximado de 700 pares de bases del gen. La amplificación del segmento del gen 16S rRNA se realizó utilizando los cebadores 16SF-104 y 16SR-472 descritos por Ramírez (2004) los cuales fueron diseñados específicamente para moluscos y amplifican una porción de aproximadamente 330 pares de bases del gen; estos dos iniciadores han sido utilizados con éxito en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la FCB-UNMSM en muchos grupos de caracoles terrestres endémicos. Para la amplificación del marcador nuclear 28S rRNA se emplearon los dos pares de cebadores utilizados por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) los cuales fueron 28S “S2-1145” y 28S “1128-2119”, estos amplifican secuencias contiguas y se superponen por pocos pares de bases lo cual permite amplificar una región aproximada de 1660 pares de bases en total del gen ribosomal 28S. Además, debido a que en algunos casos los resultados del secuenciamiento de la primera mitad del gen 28S rRNA “S2 – 1145” no fueron muy buenos, se tuvo que recuperar esa información de otra manera, por lo que se utilizaron los pares de cebadores LSU1 – LSU3 y LSU2 – LSU4 (Wade & Mordan 2000) para amplificar una región que toma parte del gen 28S ARNr (incluyendo la región problemática), ITS2 y 5.8S rRNA (Figuras 22 y 23).

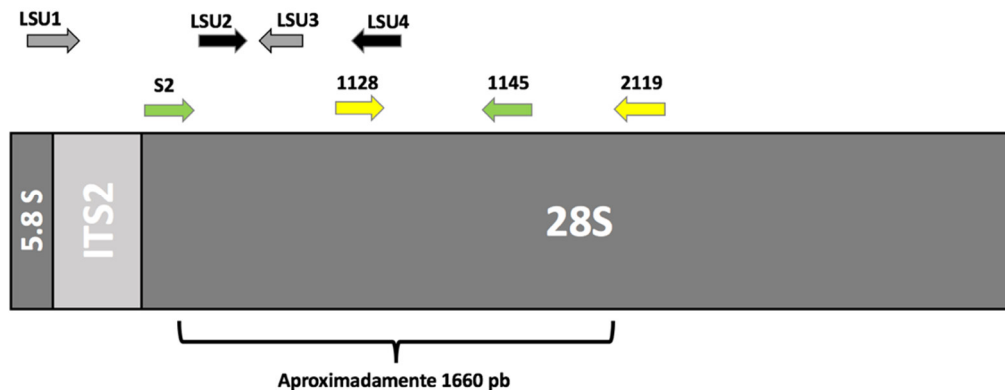


Figura 22. Marcador nuclear 28S rRNA. Esquema de la posición de los cebadores en el gen ribosomal 28S rRNA, cada par de cebadores tiene un color diferente.

```

>>>LSU1>>> 1 to 22
1 CTAGCTGCGAGAATTAATGTGAATTGCAGAACACATTGAACATCGACATCTTGAACGCATATGGCGGCCCTCGGGTCCATCCCGAGGCCACGCCCTCTGAGGGTC
1 GATCGACGCTCTTAATACACTTAACGCTCTTGTGTAACCTTGTAGCTGTAGAACTTGCCTATACCGCCGAGGCCAGGTAGGGCTCCGGTGCAGGCGAGCTCCAG
106 GCGAGTCAAAATGAAATTAAGAAATCGCTTCTGGTGAATCTGGCAATGTGGTCTGGTCTGGCGACGACCAATATATGTCACTGCTCCCTGGCTCGAGGGAGCA
106 CCGCTCAGTTTACTTTTAATCTTTAGCGAAGGACCACTTAGACCGCTTACACGACGACGACGCTGCTGGTTATATACAGTGGACGAGGACCGAGCTCCCTCGT
211 AGGGAAAAAATATTTTGGTTGTGCGCGGATTGGTCACTGGAAGCGCATGGGCTTTTCGAGGATCGCTCAGGTCTCCGTAGCTCAAGTCAAGCTGCGTCATC
211 TCCCTTTTATATAAAACCAACGCGCGCTAACAGTCACTTTCGCGGTACCCGAAAGCTCCTAGCGGAGTCCAGAGGATCGGAGTTTCACTGTCGACGAGTATC
316 AGTCTGTGGTGGTGGTCCACCACTGCTTTGTACACACAGGCTGTGCTTTTTCGCGTGGATACAGGGTCTTTCTTACACGACCTGACGCGCGCGCG
316 TCAGGACACACAGGAGTGGTACGGAACATGGTGTGTCGACAGCAAGAAACGCGACGCTATGTTCACGAAAGAGAAAGTGGTGGAGTGGCGGCGGCG
421 TCACGGCAGGACTCGGAGTGTGATTAAACCGACGGGCTACCGGACGTCGGGAGTGGTTGATGGCTGCGACGTAAGGGTAAAGTGAAAGGTGGCGCAATT
421 AGTGCGCTCTGAGCTCACATAAATTTGGTGCCTGGATGGCTTCAGGCTCCACCACTACCGACGTCGATTCCTACCTTTTCCACCTTTCCACCGCGGTAA
>>>S2>>> 572 to 594
526 ATTGGCAGTGTGTTTGTGTTTGTGCTCGACACTACGACACTCCGACCTCAGATCGGACGAGATTACCGCTGAATTTAAGCATATAACTAAGCGGAGGAAAA
526 TAACCGGTACAAACAAAAAAGAGCTGTGATGCGTGTGAGGCTGGAGTCTAGCCTGCTCTAATGGCGACTTAAATTCGTATATTGATTCGCTCCTCTTT
631 GAAACTAACAGGATTTCCACAGTACCGCGAGTGAAGCGGAAAGCCAGCAGCAATCCCTCAGTGTACGCTGACGGGAACTGTGGTGTGGGAGCGCCAT
631 CTTTGATTGTTCTTAAAGTGTCTATTGCGCTCACTTCGCCCTTTTCGGGTGCTGGCTTAGGGAGTACAGTGCAGTGCCTTTGACACCAACACCTTCGGGTA
736 CAGTCCGCTCAGAGGACACCAAGTCTCTGATCGGGCTTACCCAGAGCGGGTGAAGGCTTTGAGGTGCTCTCTGTGCGCGCGGAGGCTCTCAGGAG
736 GTCAGCGAGTCTCCCTGGCTTCAGGAGACTAGCCCCAAGTGGGTCTCGCCCATTCCTCGGAAACGTCACGAGAGACACCGCGCGCTCGCAGAGTCTCTC
>>>LSU2>>> 843 to 862
841 TCGGGTGTGTTGGGAATGCAGGCCAAAGTGGGTGGTAACTCCATCTAAGGCTAAATCTGGCAGGATCCGATAGCGGACAAGTACCGTGAGGAAAGTTGAAA
841 AGCCCAACAAACCTTACGTCGGGTTTACCCACCACTTTGAGGTAGATTCCGATTATGACCGTGTCTAGGCTATCGCTGTTTCATGGCACTCCCTTTCAACTTT
946 AGAATCTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGTATGTGAAACCGCAGAGAGTAAACGGGTGGATCCGCAAACTCGGCTCTCGGAATTCAGCGCGCGCGCGCGGAGGGC
946 TCTTGAACTTCTCTCAAGTCTCATACACTTTGGCGTGTCTCAATTTCGCCACCTAGGCGTTTACGCGAGAGGCTTAAAGTGGCGCGCGCGCGGTTCCCG
1051 TGCCTGGTTCAGGATCCCTTGAACCGGCGGTGGTCCAAAGCGGGCTCGCTGCTGCTGCTTCCGCGGACAGAGGCGCAACGGGTGGCGGAGTGGTGGT
1051 ACAGACCAAGTCTTAGGGAACCTTGGCGGACACCGGTTCCGCGGACGACGACGTAAGAGGCGCGGCTCTCTCGGTGTTGGCCAGCGCTCACACCA
1156 CACATGTCAGGAGGTTGTAGTGGGGATGCTCGTGTCCCTACAGCCCTTCAAGGTTAAGCGCTTCCGAGACGAGGAACCGCGGACGGTTCGAGGACACCTC
1156 TACTACAGTCTCCCTCAAGTGTCACTTCCAGGATGCTCGGAGTGTGCGGAGTTCCTAATGGCGGAGGCTGGCTCCTTGGCGGCGCTGCCAAGTCCGTTGGG
1261 CCGTCCGCGTGGTGTGACTGGAGAGACTGGGCAACCGTGTCTTCCCTACCGCTCACCTGCGACCGGCGGGGCTGGCGGCGCGCACAGTGTCTGGGTTT
1261 GGGAGGCCACTCAAACTGACCTCTCTGACCGTTTGGCACAGAGGATGGCGAGTGGAGCTGGCGCGCGCGCGCGGCTGTCAGACAGACCCAAA
>>>1128>>> 1396 to 1416
1366 GTGGCAAGTCTCTGGCATTTCCACAGACCGCTCTTGAACACGAGCAAGGAGTCTAATATGCGCGCGAGTCTTGGGTCTGATGAAACCCAAAGGCGAGTGA
1366 AGCCCTTCAGACCGCTTACGTCGGGTTTACCCACCACTTTGAGGTAGATTCCGATTATGACCGTGTCTAGGCTATCGCTGTTTCATGGCACTCCCTTTCAACTTT
1471 AAGCAGGGTCTCTACAGTGGCGGAGTGGGATCTTCCCGCTCTCGGAGCAATCTGTGTGGGGTGGCGACACCGCGCGCTCCCTCTCGCTCGGAGTGA
1471 TTGCTCCAGCAGATGCTCACCAGGTCACCTTAGAAGGGGAGGAGCTCGTTAGACACAACCCACCGCTGTGGTGGCGGCGAGCGACGACGCTCAG
>>>1145>>> 1644 to 1665
1576 GGGCGGAGCAAGAGCTGCACGCTGGGACCGGAAAGATGGTGAACATGCTGTAGTAGAATGAAGCCAGAGGAACTCTGTGGAGGTTCTGACGATTTGACG
1576 CCGCGCTCTGTTTCGACGCTGCGACCTTGGGCTTTTACCACTTGTATACGAGTCTTACTTCTGCTCTCTTGGAGACCACTCAAGCATTCGTAAGACTGC
1681 TGCAAAATCGATCGTCAAACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATGAACCACTTACTAGTGGTTCCTCGAAGTTCCCTCAGGATAGCTGGCGCTCAATCGC
1681 ACTTTAGCTAGCACTTTGAACCAATATCCCGCTTCTGATTAGCTTGGTAGATCATGACCAAGGAGGCTTCAAGGGAGTCTCATGACCGCGAGTTAGCG
1786 ACTTTTATCGCTTAAAGCAATGATTAGAGTCTTGGGACGAAACGACCTCAACCTATTCTCAAACTTTAAATGGTAAAGAGTCCGCTCGCTCGATGGAGC
1786 TCAAAATAGGCATTTTCCTTACTTAATCTCAGAACCCCTGCTTGTCTGGAGTTGGATAAGAGTTTGAATTTAACCATTCTTACGCGGAGGAGCTGACCTCG
1891 CGGGCGCTGCGAATGCGTGTGCAAGTGGGCACTTTTGTAAAGCAAACTGGCGCTGTGGGATGAACCAACGCGGTTAAGGTGCCAAATCTTGACGCTC
1891 GCGCGGCGACAGCTTACGACACGCTTACCGGTGAAACCAATCTCTTACCGCGACACCTTACTTGTGTTGGCGGCAATTCACGCTTACGACTCGGAG
1996 ATCAGACACCAATAAAGGTTGTTGATATAGACGACGAGGAGGCGGATGGAAGTCGGAACCGCTAAGGAGTGTGTAACCACTCACTGCCAATCAACCA
1996 TACTCTGTGTTATTTTCCACAACTATATCTGTCTGCTTGCACCGGTACTTCAAGCTTGGCGATTCCTCACACTTTTGTGAGGAGCGCTTGTGTTGTT
2101 GCGCTGAAATGATGCGCTAGAGCTCGGACCTATACCGGCGGCTCTCGCAATCGAAGCAAGCAATCAAGGCGGAGACGAGTAGGAGGCGGCTCGGCGTGA
2101 CGGGACTTTTACTACCGGATCTCGCAGCTTGGATATGGCCCGGACAGGCTTACTTGTCTGTTTGTAGTTCGGCTCTGTCTATCTCCCGGAGCGCCACT
>>>2119>>> 2250 to 2270
2206 GCGTGAAGCTTGGGAGGAGTCTTGGGTGGAGCGCGCGCGCGCGCGGCTTGGTGGTAGTAGC
2206 CGCACCTTCGGACCCCTCGCTAGGACCCACTTCGGCGGGGCGACGCTAGAACCCATCATCG

```

Figura 23. Secuencia de ADN nuclear 5.8S rRNA, ITS2 y 28S rRNA de *Andiniastra violascens* de código “R2” y los sitios de unión a los cebadores que se usaron. Los cebadores “hacia delante” están resaltados en fucsia y los reversos en naranja. Obtenido con la herramienta “Primer Map” en “Sequence Manipulation Suite” (Stothard 2000).

Tabla 3. Cebadores usados en este estudio y su origen.

Cebador	Dirección	Secuencia (5' – 3')	Fuente:
LCO 1490	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGL	Folmer <i>et al.</i> (1994)
HCO 2198	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCAL	Folmer <i>et al.</i> (1994)
16SF-104	Forward	GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT	Ramírez (2004)
16SR-472	Reverse	TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA	Ramírez (2004)
28S1128	Forward	CGTCTTGAAACACGGACCAAG	Uit de Weerd & Gittenberger (2013)
28S2119	Reverse	GCTACTACCACCAAGATCTGC	Uit de Weerd & Gittenberger (2013)
28S - S2	Forward	GACCTCAGATCGGRCGAGATTAC	Uit de Weerd & Gittenberger (2013)
28S- 1145	Reverse	GAACCTCCACCAGAGTTTCCTC	Uit de Weerd & Gittenberger (2013)
LSU1	Forward	CTAGCTGCGAGAATTAATGTGA	Wade & Mordan (2000)
LSU3	Reverse	ACTTTCCCTCACGGTACTTG	Wade & Mordan (2000)
LSU2	Forward	GGGTTGTTTGGGAATGCAGC	Wade & Mordan (2000)
LSU4	Reverse	GTTAGACTCCTTGGTCCGTG	Wade & Mordan (2000)

Debido a que se está trabajando con muestras de caracoles endémicos, las reacciones de PCR fueron realizadas inicialmente a un volumen total de 12.5µl y luego, cuando los resultados fueron positivos, se repitieron las reacciones a 30 µL de volumen total para su posterior secuenciamiento. La concentración final usada en cada mezcla de PCR fue de Buffer TB a 1X, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM por cada cebador, 1.5mM de MgCl₂ y 0.04 unidades/µl de Taq DNA polimerasa y de 1 a 2 µL de ADN genómico (de un stock estandarizado a una concentración de aproximadamente 20 ng/µl) para obtener de 20 a 40 ng de ADN molde en cada reacción. Solo en el caso de los marcadores 28S rRNA (ambos pares de cebadores) se realizó una modificación del protocolo descrito por Ramírez (2004) donde se utilizó una concentración final de MgCl₂ de 0.5 mM.

La amplificación de los marcadores se realizó en un termociclador 2720 de Applied Biosystems (ABI) y la programación fue diferente para cada marcador lo cual está detallado en la Tabla 4.

Tabla 4. Ciclaje de la amplificación por PCR.

Marcador	Programa	T°C Hibridación
COI	[94°C(30'')+Tm (35'')+72°C(45'')] \times 35	48 – 50 °C
16S rRNA	[94°C(30'')+Tm (35'')+72°C(35'')] \times 35	52°C
28S 1128-2119	[94°C(30'')+Tm (40'')+72°C(50'')] \times 35	50.7°C
28S S2-1145	[94°C(30'')+Tm (40'')+72°C(50'')] \times 35	53.1°C
LSU1 – LSU3	[94°C(30'')+Tm (30'')+72°C(60'')] \times 35	52°C
LSU2 – LSU4	[94°C(30'')+Tm (30'')+72°C(60'')] \times 35	52°C

5.6 Visualización de amplicones

Se realizaron electroforesis submarinas en buffer TB 0.5X, en geles de agarosa al 1% o 2% teñidos con Syber Green al 1%. Cada pocillo del gel se cargó con la mezcla de 4 μ l de cada producto de PCR y 1 μ l de buffer de carga, se programó la fuente de poder durante 30 minutos a 80V para geles al 1% o durante 25 minutos a 105V para geles al 2%. Las bandas se revelaron por exposición del gel a un transiluminador Safe Imager 2.0 Blue Light. Para la identificación de las bandas se tomó como referencia un marcador de tamaño molecular de 75-20000 pb de ThermoScientific. Se consideró como resultado positivo cuando se pudo observar únicamente una banda luminosa del tamaño esperado en el carril del gel, lo que significa que solamente ha amplificado el gen de interés mas no otro. Los tubos de PCR con las reacciones que se consideraban positivas fueron almacenados a -20°C hasta el momento del secuenciamiento.

5.7 Purificación de amplicones y secuenciamiento

Los amplicones que cumplen con los estándares esperados (buena resolución de banda y sin bandas inespecíficas o dobles) para todos los marcadores empleados, son etiquetados y enviados a la compañía coreana MacroGen Inc para su purificación y secuenciamiento por ambas hebras. Los resultados de las reacciones de secuenciamiento son recibidos por el laboratorio en diversos formatos, entre ellas la versión editable en formato AB1.

5.8 Edición y Alineamiento múltiple de las secuencias

Se realizó la evaluación y la edición de los cromatogramas, que son resultado del secuenciamiento hecho por la empresa MacroGen Inc., en el programa Chromas Lite (McCarthy 1996). En todos los casos el secuenciamiento se realizó por ambas hebras (forward y reverse) por lo que, luego de la evaluación, las secuencias consenso fueron obtenidas comparando la información de ambas hebras mediante el programa en línea CAP3 (Huang & Madan 1999). De manera especial, para obtener la secuencia completa del primer fragmento del marcador 28S rRNA, se tuvo que realizar un consenso comparando lo obtenido por los pares de cebadores “28S S2 – 1145”, “LSU1 – LSU3” y “LSU2 – LSU4”. Para verificar la obtención de las secuencias deseadas y evaluar por posible contaminación y amplificación errónea, se hizo un cotejado de nuestras secuencias con todas las disponibles en el GenBank usando la herramienta Blast (“Basic Local Alignment Search Tool”) en esta plataforma (Madden, 2002). Todos los alineamientos se realizaron en ClustalX 2.1 y la edición de las mismas en BioEdit.

5.9 Minería de datos y cobertura de géneros estudiados

Se realizó una búsqueda de secuencias similares a la del marcador 28S rRNA de la muestra T11 usando la herramienta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) en la base de datos del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”), para poder recuperar secuencias de otros estudios e incluirlas en nuestro análisis (Figura 24), todas las secuencias recuperadas estaban incluidas en el artículo publicado por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) donde todas menos una fue información inédita en su momento.

Se ha podido recopilar información de la existencia de 27 géneros de Peruiniinae, de los cuales existen 9 secuencias disponibles en GenBank y que se suma a las 2 secuencias inéditas de 28S rRNA, presentadas en este estudio, pertenecientes a dos géneros de los cuales no existía información de este tipo hasta la fecha. Cabe mencionar que *Cylindronenia cicatricosa leimebambensis* fue la única especie de la cual obtuvimos secuencia de este marcador que también estaba disponible en Genbank. La cobertura total de géneros incluidos en este estudio fue de 40.7% de los Peruiniinae (Tabla 5). También se incluyeron dos secuencias por subfamilia de Clausiliidae como grupo externo (Tabla 6).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Cylindronenia cicatricosa leimebambensis isolate 3098 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2811	2811	95%	0.0	98%	JX098084.1
<input type="checkbox"/>	Steeriana malleolata isolate 3099 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2806	2806	95%	0.0	98%	JX098086.1
<input type="checkbox"/>	Andinia taczanowskii isolate 3302 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2791	2791	95%	0.0	98%	JX098085.1
<input type="checkbox"/>	Temesa clausilioides isolate 3100 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2774	2774	95%	0.0	97%	JX098081.1
<input type="checkbox"/>	Cyclonenia gibber isolate 3299 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2758	2758	95%	0.0	97%	JX098079.1
<input type="checkbox"/>	Garnieria mouhoti isolate 3089 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	95%	0.0	97%	JX098074.1
<input type="checkbox"/>	Incania papillosa papillosa isolate 3300 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2743	2743	95%	0.0	97%	JX098078.1
<input type="checkbox"/>	Nenia tridens 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	96%	0.0	97%	EU409911.1
<input type="checkbox"/>	Peruinia peruana fiachi isolate 1824 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2708	2708	95%	0.0	97%	JX098082.1
<input type="checkbox"/>	Charpentieria itala albopustulata isolate 3142 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2706	2706	95%	0.0	97%	JX098104.1
<input type="checkbox"/>	Grandinenia arduiniana isolate 3093 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2704	2704	95%	0.0	97%	JX098075.1
<input type="checkbox"/>	Alopia bielzii clathrata isolate 3802 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2700	2700	95%	0.0	97%	JX098097.1
<input type="checkbox"/>	Pontophaedusa funiculum isolate 1826 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2699	2699	95%	0.0	97%	JX098070.1
<input type="checkbox"/>	Zilchiella scala isolate 3301 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2697	2697	95%	0.0	97%	JX098080.1
<input type="checkbox"/>	Charpentieria lamellata isolate 3812 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2691	2691	95%	0.0	97%	JX098105.1
<input type="checkbox"/>	Delima hiltrudis isolate 3804 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2691	2691	95%	0.0	97%	JX098102.1
<input type="checkbox"/>	Macedonica pangaionica pangaionica isolate 341 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2680	2680	94%	0.0	97%	JX098101.1
<input type="checkbox"/>	Cochlodina orthostoma orthostoma isolate 3811 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2678	2678	95%	0.0	96%	JX098100.1
<input type="checkbox"/>	Grandinenia fuchsi cinderella isolate 3798 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2676	2676	95%	0.0	96%	JX098076.1
<input type="checkbox"/>	Cochlodina laminata laminata isolate 3803 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2669	2669	95%	0.0	96%	JX098099.1
<input type="checkbox"/>	Incaglaia adusta tumens isolate 3097 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2658	2658	95%	0.0	96%	JX098083.1
<input type="checkbox"/>	Dilatatoria succineata succineata isolate 3805 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2656	2656	95%	0.0	96%	JX098103.1
<input type="checkbox"/>	Megalophaedusa martensi isolate 3799 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	95%	0.0	96%	JX098066.1
<input type="checkbox"/>	Papillifera bidens bidens isolate 787 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	94%	0.0	97%	JX098106.1
<input type="checkbox"/>	Serrulina serrulata isolate 3054 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	95%	0.0	96%	JX098067.1
<input type="checkbox"/>	Arion hortensis isolate O. arih. c 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sr	2630	2630	100%	0.0	95%	KU341315.1
<input type="checkbox"/>	Nenisca franzi isolate 3141 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2630	2630	94%	0.0	96%	JX098077.1
<input type="checkbox"/>	Hemiphaedusa kosakai isolate 3800 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	2630	2630	95%	0.0	96%	JX098065.1

Figura 24. Resultados de la búsqueda de secuencias parecidas a las que obtuvimos en la base de datos de NCBI usando BLAST.

Tabla 5. Cobertura de 40.7%. En este estudio se han utilizado secuencias de 28S rRNA de 11 de los 27 géneros de Peruiniini descritos.

Familia Clausiliidae			
Subfamilia Neniinae			
Tribu Peruiniini			
Género	En este estudio	# Accesión	Referencia
<i>Andiniastra</i>	<i>Andiniastra violascens</i>	NUEVO T22 T24	Este estudio
<i>Andinia</i>	<i>Andinia taczanowskii</i>	JX098085.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Andiniella</i>	-	-	-
<i>Bequaertinenia</i>	-	-	-
<i>Brevinenia</i>	-	-	-
<i>Columbinia</i>	-	-	-
<i>Cyclonenia</i>	<i>Cyclonenia gibber</i>	JX098079.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Cylindronenia</i>	<i>Cylindronenia cicatricosa</i> <i>leimebambensis</i>	JX098084.1 NUEVO T26	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Ehrmanniella</i>	-	-	-
<i>Gonionenia</i>	-	-	-
<i>Gracilinenia</i>	-	-	-
<i>Incaglaia</i>	<i>Incaglaia adusta tumens</i>	JX098083.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Incania</i>	<i>Incania papillosa papillosa</i>	JX098078.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Hemicena</i>	-	-	-
<i>Leuconenia</i>	-	-	-
<i>Neniptyx</i>	-	-	-
<i>Neniatracta</i>	-	-	-
<i>Neniella</i>	-	-	-
<i>Neniops</i>	-	-	-
<i>Parabalea</i>	-	-	-
<i>Peruinia</i>	<i>Peruinia peruana flachi</i>	JX098082.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Pfeifferiella</i>	-	-	-
<i>Pseudogracilinenia</i>	-	-	-
<i>Steeriana</i>	<i>Steeriana malleolata</i>	JX098086.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Symptychiella</i>	<i>Symptychiella sp.</i>	NUEVO S75 y S76	Este estudio
<i>Temesa</i>	<i>Temesa clausilioides</i>	JX098081.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013
<i>Zilchiella</i>	<i>Zilchiella scala</i>	JX098080.1	Uit de Weed & Gittenberger 2013

Tabla 6. Secuencias de 28S rRNA de Clausiliidae obtenidas de GenBank que fueron usadas como grupos externos. Todas las secuencias provienen de Uit de Weerd & Gittenberger (2013) excepto EU409911.1 (Uit de Weerd, 2008).

Subfamilias	Especie	Número de Accesión
Garnieriinae	<i>Garnieria mouhoti</i>	JX098074.1
	<i>Grandinenia ardouiniana</i>	JX098075.1
Phaedusinae	<i>Hemiphaedusa kosakai</i>	JX098065.1
Serrulinae	<i>Serrulina serrulata</i>	JX098067.1
Laminiferinae	<i>Neniatlanta pauli</i>	JX098072.1
	<i>Bofilliella subarcuata</i>	JX098073.1
Neniinae	<i>Nenia tridens</i>	EU409911.1
(Tribus Neniini)	<i>Nenisca franzi</i>	JX098077.1
Alopiinae	<i>Lampedusa lopadusae</i>	JX098088.1
	<i>Delima hiltrudis</i>	JX098102.1
Mentissoideinae	<i>Boettgeria deltostoma</i>	JX098107.1
	<i>Idyla bicristata</i>	JX098110.1

5.10 Caracterización de las secuencias

Luego de la verificación, las secuencias de cada marcador molecular fueron alineadas usando el programa ClustalX2 (Larkin *et al.* 2007) y corregidas manualmente mediante el programa Bioedit (Hall 1999), lo que nos permitió identificar similitudes entre ellas y reconocer regiones conservadas y variables.

Para evaluar la composición y proporción de las bases de cada marcador molecular, así como para evaluar si existe saturación molecular, se utilizó el programa DAMBE (Xia & Xie 2001). El número de haplotipos e indicadores de diversidad genética dentro de cada especie fue determinada mediante el programa DnaSP (Rozas *et al.* 2003), MEGA 7 (Tamura *et al.* 2011) y ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Algunos estadísticos generales, así como imágenes mostradas, fueron obtenidos usando el programa Geneious (Kearse *et al.* 2012). Los marcadores mitocondriales se analizaron por separado y en conjunto; para concatenar los datos se utilizó el programa SequenceMatrix (Vaidya *et al.* 2010). También se realizó una comparación de las secuencias aminoacídicas predecidas de los marcadores COI de *Andiniastra violascens* y *A. aff. violascens*. El marco de lectura se halló utilizando la herramienta de traducción de nucleótidos del servidor en línea ExPASy (www.expasy.org) donde se seleccionó el marco de lectura que no presentaba codones de fin de lectura o “stop codon”. La predicción de aminoácidos fue llevada a cabo usando el código genético 5 de genoma mitocondrial de invertebrados, y el alineamiento se realizó en MEGA7, en donde se evidenciaron los cambios.

5.11 Código de barras de ADN

Se obtuvieron parámetros comúnmente usados en este tipo de estudios, tales como la cobertura del estudio que representa el porcentaje de especies utilizadas en relación al total descrito y el “Barcode Gap” o brecha del código de barras que está definido como la diferencia entre la distancia intraespecífica contra la interespecífica (vecino más cercano) de una especie (Meyer & Paulay 2005). La mayoría de los análisis de código de barras se realizaron en la plataforma del sistema BOLD, para lo que se creó un proyecto privado donde se cargaron las secuencias de COI de este estudio. Además, se construyó la topología usando el algoritmo del vecino más próximo “neighbour-joining” (NJ) en Mega versión 7 (Tamura *et al.* 2011) bajo el modelo de distancias genéticas de Kimura 2 parámetros (K2P) usando la opción de delección a pares (“*pairwise deletion*”) para el tratamiento de brechas (“*gaps*”) y datos perdidos. La robustez de la topología fue evaluada por análisis no paramétricos tipo “*bootstrap*” o de remuestreo (Felsenstein 1985) con 1000 repeticiones.

5.12 Posición y origen de *Andiniastra violascens* dentro de la familia Clausiliidae y tiempos de divergencia.

Para develar la posición de *Andiniastra violascens* en la familia Clausiliidae se recuperaron todas las secuencias de 28S rRNA de Clausiliidae provenientes de Sudamérica disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI) hasta ese momento, siendo éstas un total de nueve. También se incluyeron dos secuencias de Clausiliidae de los otros grupos descritos por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) como grupo externo. Además, solo se contó con las secuencias de COI y 16S rRNA de Clausiliidae peruanos generadas en este estudio, siendo éstas las primeras de su tipo. En total se examinaron cuatro set de datos: COI, 16S, 28S

y el set de datos concatenados COI + 16S, usando PhyML 3.1 (Guindon *et al.* 2010) para el método de Máxima verosimilitud (MV) y MrBayes v3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) para Inferencia Bayesiana (IB). Para cada gen o partición, se seleccionó y especificó un modelo de sustitución y tasa de heterogeneidad (α) usando el criterio de información Akaike (AIC) implementado en jModeltest 2.1.1 (Posada, 2008) y MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). A parte de esto, se mantuvieron los modelos y ajustes por defecto de PhyML y MrBayes. Se realizaron 1000 repeticiones por el método de remuestreo bootstrap para evaluar el soporte de los nodos de los árboles MV, mientras que el soporte de los nodos en el árbol IB fue evaluado considerando el nivel de probabilidad posterior bayesiana de los árboles IB. Los análisis en PhyML no soportaban particiones (especificación de un modelo por marcador en el análisis de datos concatenados) por lo que, para obtener el árbol MV del set de datos concatenados COI y 16S rRNA, se usó el modelo y tasa de heterogeneidad seleccionado usando ambos marcadores en conjunto. Cada análisis de MrBayes consistió en dos corridas simultáneas, cada una empleando cuatro cadenas de Markov en sus condiciones preestablecidas. Ambas corridas consistieron en 1 000 000 de generaciones con una frecuencia de muestreo de 100. Se evaluó que la desviación estándar de ambas corridas independientes del análisis MCMC sea menor 0.01 y se descartó el 25% inicial de todos los árboles generados ("Burn-in"). Finalmente, para hallar los tiempos de divergencia entre las poblaciones de *Andiniastra* del departamento de Cajamarca y de Amazonas, se realizó una calibración secundaria del reloj molecular en MEGA7 usando los tiempos de divergencia del clado de Peruiniinae descrito en Uit de Weerd & Gittenberger (2013).

6. RESULTADOS

6.1 Resultados Generales de los Procedimientos Moleculares

Cuantificación de ADN

La lista de las muestras de ADN obtenidas, sus códigos de extracción, valores de cuantificación, así como la lista de secuencias de ADN obtenidas finalmente, se pueden apreciar en la Tabla 7. La concentración recuperada promedio fue de 102 ng/uL (min: 17 ng/uL, max: 293 ng/uL) y la recuperación de ADN fue notablemente mayor en los individuos de *A. aff. violascens* (166.32 ng/uL), esto se debe principalmente a que es la más grande en tamaño de todas las especies estudiadas y se pudo extraer más cantidad de músculo del pie. La calidad de ADN extraído, evidenciado por la razón de las absorbancias A260/280, cayó en el rango de 1.70 y 2.0, salvo un par de excepciones, lo cual significa muy buenos niveles de pureza ya que este cociente debería estar alrededor de 1.8 según el manual. Cabe destacar que aunque en el manual del producto indica que es suficiente cargar 1.0 µL de ADN al Nanodrop para su cuantificación, en la práctica fue más conveniente usar siempre 1.5 µL ya que los valores de las repeticiones eran muy variables cuando se usaba menos cantidad.

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de ADN y lista de los marcadores moleculares secuenciados

Especie	Código	Cuantificación de ADN		Marcadores (tamaño molecular)					
		[ng/ul]	A260/280	COI (706)	16S (339)	28S-I (840)	28S-II (890)	LSU 1-3	LSU 2-4
<i>Andiniastra violascens</i>	T21								
	T22	30.4	1.71	✓	✓	✓	✓		
	T23	84.0	1.80	✓	✓		✓		
	T24	95.5	1.79	✓	✓	✓	✓		
	o98	17.2	2.08	✓	✓				
	o99	72.0	1.97	✓	✓				
	o100	41.1	1.84	✓	✓		✓	✓	
	r1	57.4	1.89	✓	✓				
	r2	93.2	1.95	✓	✓		✓	✓	✓
<i>C. cicatricosa leimebambensis</i>	T25	63.7	1.82	✓	✓		✓		
	T26	44.6	1.80	✓	✓	✓	✓		
	T27	70.2	1.80		✓		✓		
	T28	31.0	1.79		✓		✓		
	o93	59.9	1.85	✓	✓				
	o94	66.5	2.26	✓	✓				
	o95	65	1.98	✓	✓				
	o96	78.1	1.97	✓	✓		✓	✓	
	o97	36.3	1.97	✓	✓		✓	✓	
<i>Andiniastra aff. violascens</i>	o67	140.6	1.75	✓	✓		✓		✓
	o68	293.4	1.79	✓	✓			✓	
	o69	155.0	1.80	✓	✓				
	o70	141.3	1.72	✓	✓				
	o71	108.7	1.66	✓	✓				
	o72	242.9	1.79	✓	✓				
	T11	157.7	1.76	✓	✓	✓	✓	✓	
	T12	171.2	1.78	✓	✓		✓		
	T13	130.1	1.78	✓	✓		✓	✓	
	T14	122.3	1.74		✓				
<i>Symptychiella sp.</i>	s75	67.1	1.87	✓	✓	✓	✓	✓	
	s76	33.1	1.84	✓	✓	✓	✓	✓	
	s77	53.2	1.89	✓	✓			✓	
	s78	90.3	1.74	✓	✓				

Obtención de amplicones

La amplificación de los marcadores 16S rRNA y COI tuvo un alto nivel de éxito utilizando los cebadores y protocolos descritos respectivamente por Ramírez (2004) y Folmer (Folmer *et al.* 1994), respectivamente, y que son usados de manera rutinaria en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía (UNMSM).

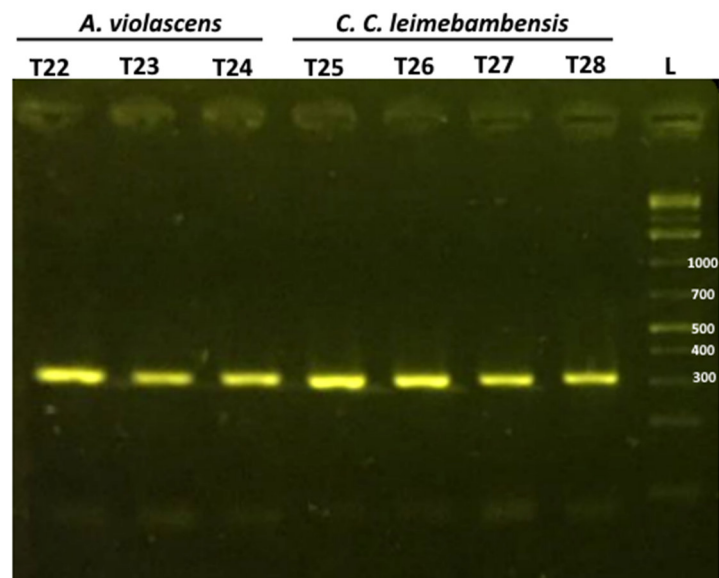


Figura 25. Gel de electroforesis del marcador 16S rRNA, agarosa 2%, $T_m=52^{\circ}\text{C}$, amplicón de aproximadamente 300 pb. Protocolos y cebadores de Ramírez (2004).

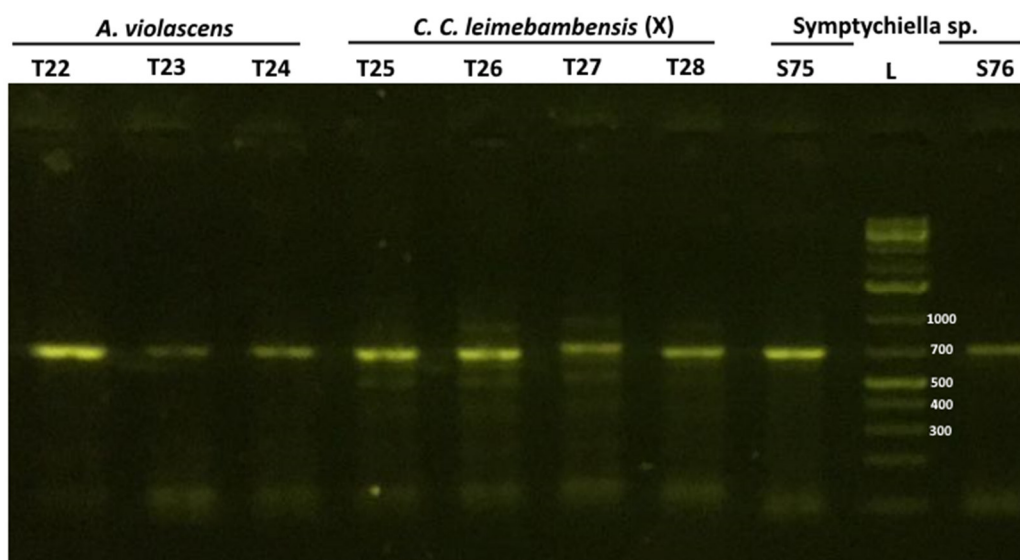


Figura 26. Gel de electroforesis del marcador COI, agarosa 1%, $T_m=46^{\circ}\text{C}$, amplicón de aproximadamente 700 pb. Protocolos y cebadores (Folmer et al 1994), (Ramírez 2004). T25 – T28 con bandas múltiples, se solucionó aumentando la temperatura.

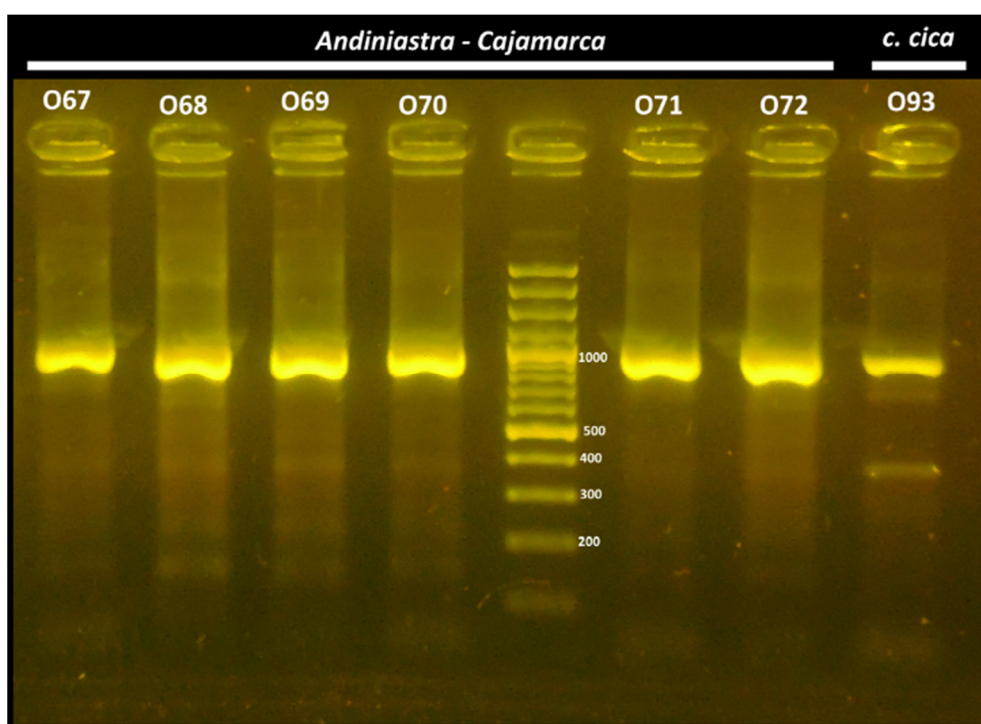


Figura 27. Gel de electroforesis del marcador 28S-I "1128-2119", agarosa 1%, $T_m=54^{\circ}\text{C}$, amplicón de aproximadamente 900 pb. Cebadores descritos en Uit de Weerd & Gittenberger (2013). Bandas múltiples en todos los amplicones, no se logró solucionar variando la temperatura de hibridación.

El marcador 28S rRNA fue obtenido utilizando dos pares de cebadores que amplifican dos regiones a las que llamamos 28S-I (28S S2 – 1145) y 28S-II (28S 1128 – 2119) (Uit de Weerd & Gittenberger, 2013). La obtención de estos amplicones resultó complicada debido a la presencia de bandas múltiples que no desaparecían realizando modificaciones en la temperatura de hibridación y concentraciones de $MgCl_2$. Luego de diversos ensayos, se estandarizó un ajuste en el protocolo utilizado en amplificación que consistió en la disminución de la concentración final de $MgCl_2$ de 1.5mM a 0.5 mM. El primer segmento fue casi imposible de amplificar en una sola banda, así que usamos otros dos pares de primers que amplifican el extremo 5' del 28S rRNA (LSU1-3 y LSU2-4) (Wade & Mordan, 2000).

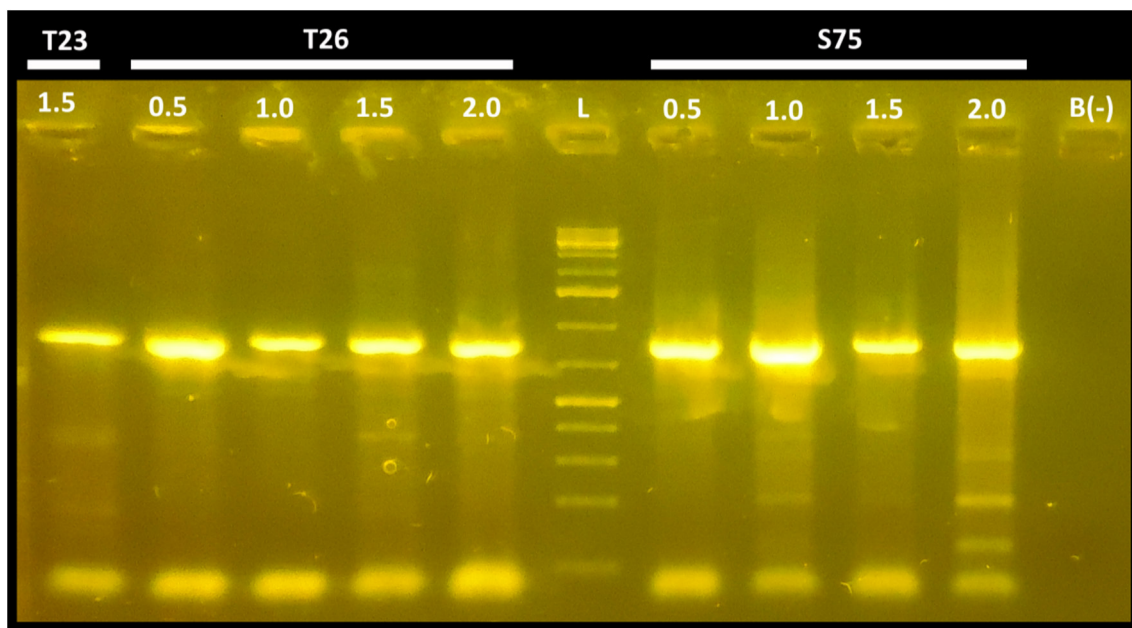


Figura 28. Ensayo de gradientes de concentración de $MgCl_2$. Gel de electroforesis del marcador 28S-I “1128-2119”, agarosa 1%, $T_m=50^\circ C$. El mejor resultado se obtuvo con concentraciones de 0.5mM y 1.0mM y se optó por el primero en las siguientes reacciones.

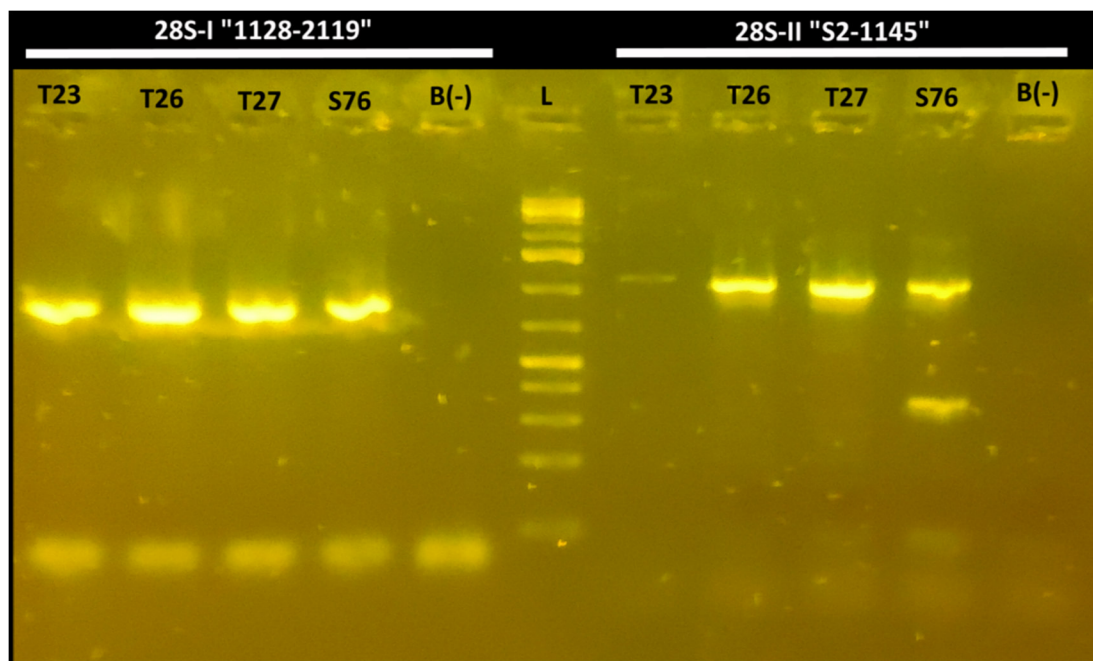


Figura 29. Gel de electroforesis de los dos marcadores 28S “1128-2119” y “S2-1145”, agarosa 2%, $T_m=52^\circ C$. Protocolo estandarizado en este estudio modificando la concentración de $MgCl_2$ de 1.5mM a 0.5mM.

6.2 Caracterización de las secuencias de ADN

El análisis de la variación genética de los marcadores COI, 16S rRNA y 28S rRNA se puede observar en la Tabla 8. El %GC más alto lo obtuvo el marcador 28S rRNA y a la vez es el marcador con más sitios conservados (Figura 32), lo que se espera para marcadores nucleares, evidenciando así su utilidad para filogenias profundas. Los alineamientos también revelaron que aunque el marcador COI y 16S rRNA tienen valores similares de identidad a pares y contenido CG, el marcador 16S rRNA tiene más regiones sin mutaciones (Figuras 30 y 31), esto se debe a que 16S rRNA tiene zonas conservadas y variables debido a su función biológica (Kjer 1995). Por la misma razón fue más sencillo amplificar el marcador 16S rRNA, lo que se ve reflejado en el número de secuencias obtenidas (n).

Tabla 8. Variación genética de los marcadores COI, 16S rRNA y 28S rRNA

Marcador	Longitud (pb)	Sec. (n)	Sitios idénticos	Identidad a pares	%CG	%A	%C	%G	%T
COI	706	28	483 (68.4%)	85.2%	36%	26%	16.5%	19.5%	38%
16S	339	31	208 (61.4%)	81.9%	31.1%	35.9%	13.1%	18%	33%
28S	1660	26	1333 (80.3%)	95.8%	59.5%	22.4%	26.5%	33%	18.1%

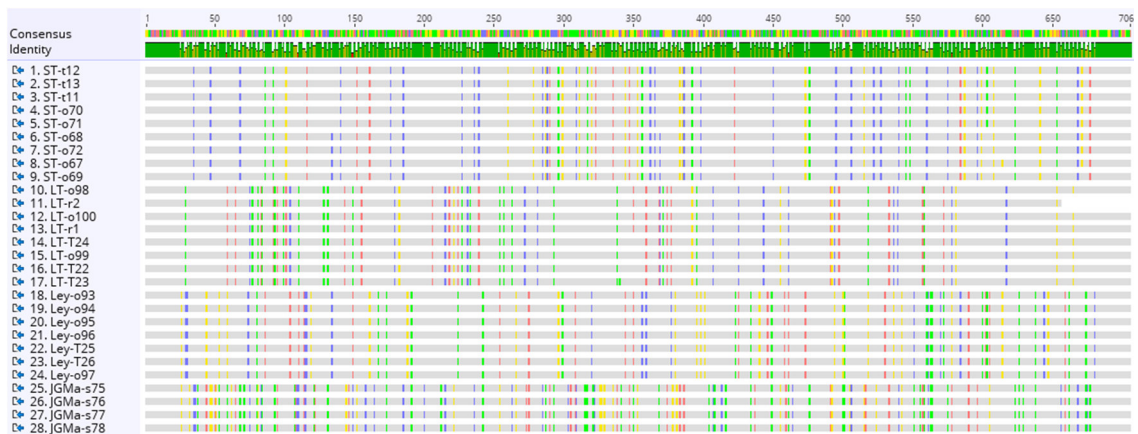


Figura 30. Alineamiento de las secuencias de COI. Vista esquemática del alineamiento obtenido usando ClustalX implementado en Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.

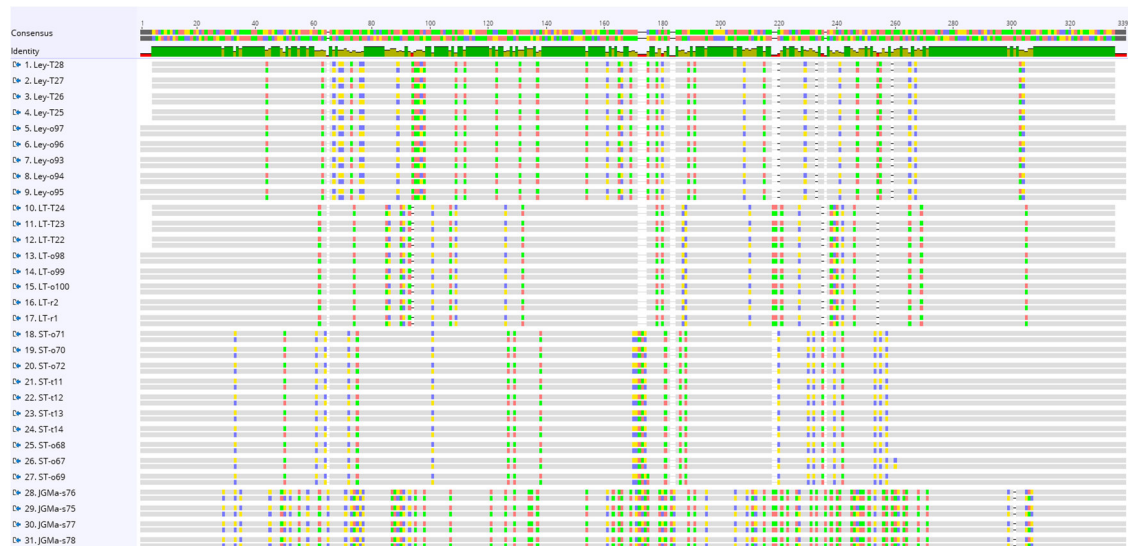


Figura 31. Alineamiento de las secuencias de 16S rRNA. Vista esquemática del alineamiento obtenido usando ClustalX implementado en Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.

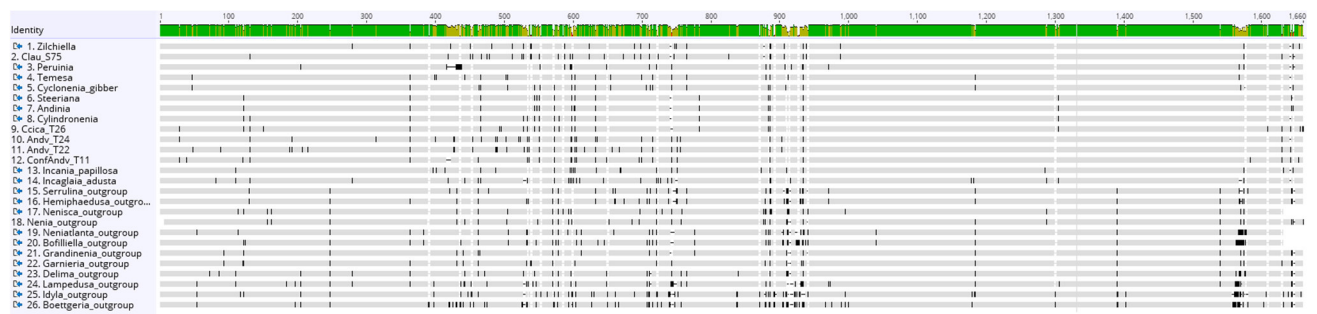


Figura 32. Alineamiento de las secuencias de 28S rRNA. Vista esquemática del alineamiento obtenido del plug-in ClustalX en el programa Geneious. Las áreas grises son los sitios comunes del alineamiento.

Análisis de la Saturación Molecular

El análisis de la saturación molecular realizado en DAMBE, reveló que las secuencias de COI habían llegado a la saturación en cuanto a transiciones pero no en cuanto a transversiones (Figura 33), mientras que para 16S rRNA no se evidenció saturación (Figura 34). De igual manera, no se evidenció saturación molecular en el marcador 28S rRNA, lo que era de esperar teniendo en cuenta que es el marcador que posee la menor tasa de evolución entre los 3 estudiados.

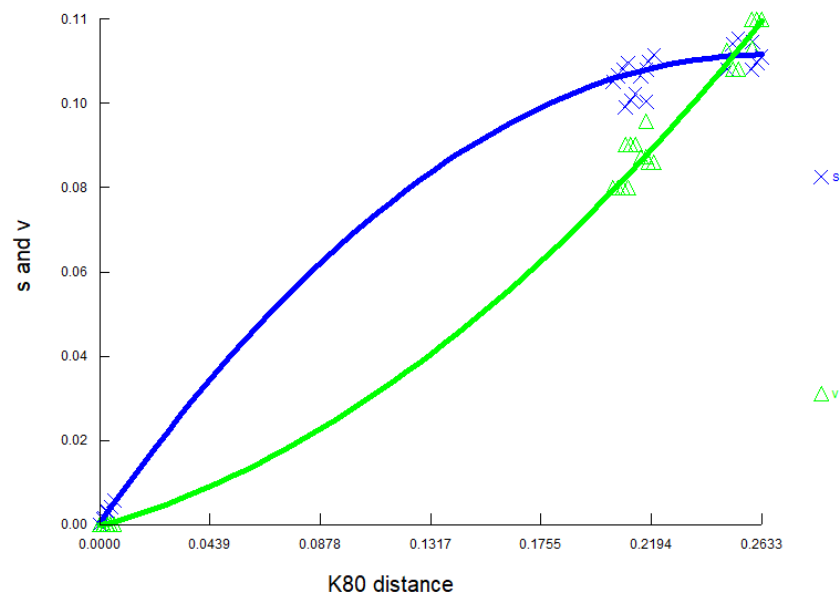


Figura 33. Análisis de la saturación molecular en el marcador COI. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo K80; s: transiciones; v: transversiones.

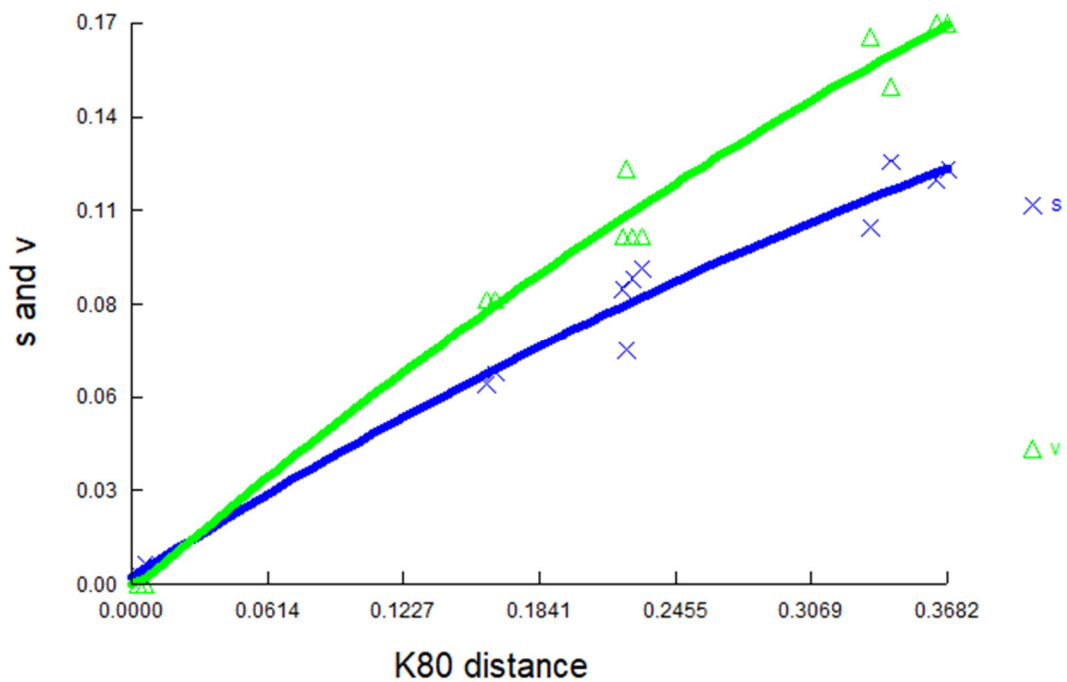


Figura 34. Análisis de la saturación molecular en el marcador 16S rRNA. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo K80; s: transiciones; v: transversiones.

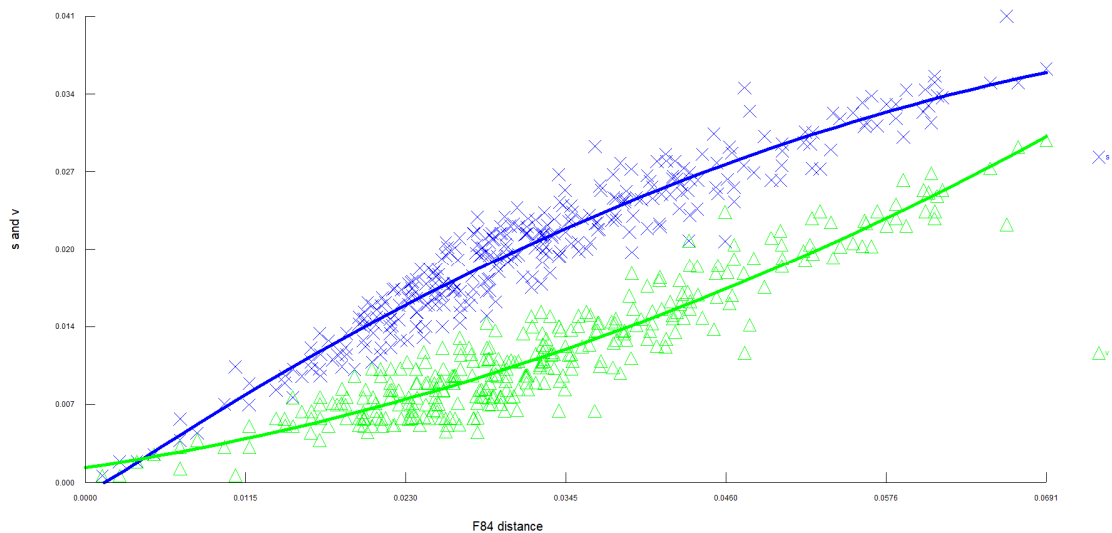


Figura 35. Análisis de la saturación molecular en el marcador 28S rRNA. Gráfico del número de transiciones y transversiones versus la divergencia genética estimada con el modelo F84; s: transiciones; v: transversiones.

6.3 Posición evolutiva de *Andiniastra violascens* en la filogenia de Clausiliidae a nivel mundial

Se obtuvieron dos secuencias completas del marcador 28S rRNA (segmentos 28S-I y 28S-II) de *Symptychiella* sp. (San Martín), una secuencia completa y dos parciales (solo 28S-II) de *Andiniastra* aff. *violascens* (Cajamarca), una secuencia completa y tres parciales de *Cylindronenia cicatricosa leymebambensis* (Amazonas) y dos secuencias completas y una parcial de *Andiniastra violascens*. Para los análisis filogenéticos se incluyeron solo las secuencias completas del marcador 28S rRNA contando con al menos una secuencia completa por especie analizada, además las secuencias parciales fueron utilizadas para corroborar que la amplificación y el secuenciamiento se realizó de manera adecuada. Las secuencias generadas de 28S rRNA de *Symptychiella* y *Andiniastra* son las primeras para esos géneros.

Los análisis filogenéticos mediante los métodos de Máxima verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) basados en el marcador 28S rRNA revelaron un clado muy bien soportado que agrupa a *Andiniastra* de Amazonas y Cajamarca, este grupo se encuentra, a su vez, cercanamente relacionado a un clado hermano conformado por *Cylindronenia*, *Steeriana* y *Andinia* (género al que *Andiniastra* fue agrupado inicialmente). En el estudio realizado por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) ya se veía una clara agrupación de *Cylindronenia*, *Steeriana* y *Andinia*, nuestros análisis revelaron que *Andiniastra* está más cercanamente relacionado con este clado que con otros clados o géneros dentro de la subfamilia Peruiniinae, además se reveló que *Symptychiella* está más cercanamente relacionado al género *Zilchiella* que a los demás géneros de Peruiniinae.

Análisis de Máxima Verosimilitud con el marcador 28S rRNA



Figura 36. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) basado en el marcador nuclear 28S rRNA usando PhyML bajo el modelo GTR+I+G seleccionado por AIC con JModelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte bootstrap (1000 repeticiones). El clado Periniinae se encuentra resaltado de verde y los nombres en azul representan las secuencias de este estudio.

Análisis de Inferencia Bayesiana con el marcador 28S rRNA

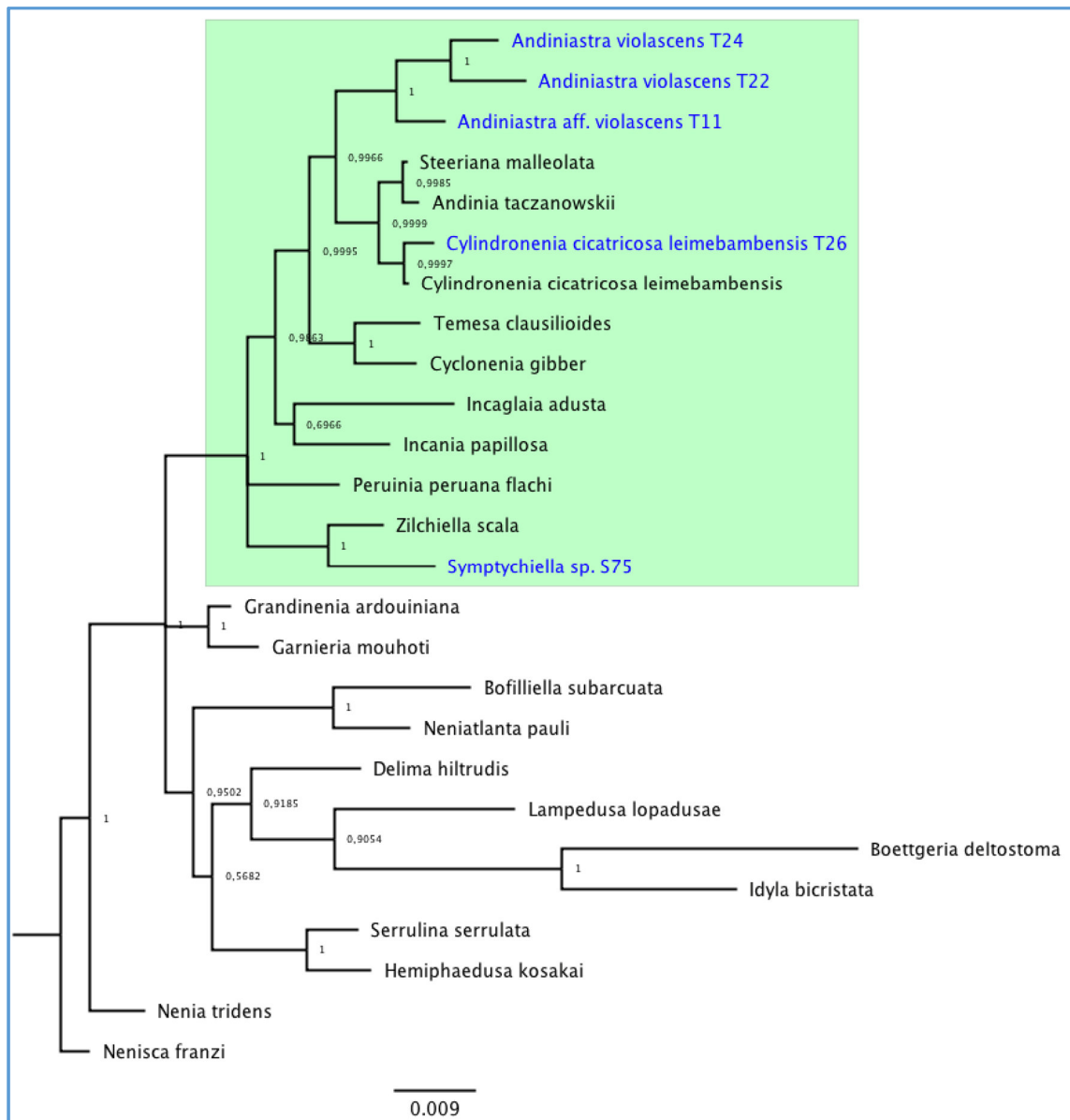


Figura 37. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana (IB) basado en el marcador molecular 28S rRNA usando MrBayes bajo el modelo SYM+G seleccionado previamente para cada uno por AIC en MrModeltest. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un burn-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética y los nodos muestran la probabilidad posterior. El clado Peruiniinae se encuentra resaltado de verde y los nombres en azul representan las secuencias de este estudio.

6.4 Relaciones filogenéticas de Peruiniinae reveladas mediante los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA

Se realizaron filogenias con los marcadores mitocondriales COI y 16S rRNA mediante los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, para ello se contó únicamente con las secuencias de Peruiniinae generadas en este estudio ya que no se han reportado otras secuencias de este tipo en la bibliografía. Además se utilizaron las secuencias de 16S rRNA y COI de *Albinaria coerulea* como grupo externo. Los análisis de máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana mediante el marcador COI (Figura 38 y 40) no mostraron información relevante debido a la falta de soporte. El análisis de máxima verosimilitud mediante el marcador 16S rRNA (Figura 39) no mostró información relevante debido a la falta de soporte, en contraste, el análisis de inferencia bayesiana (Figura 41) mostró un alto soporte (0.985 de probabilidad posterior) en el clado que agrupa *Andiniastra violascens* con *A. aff violascens*, y en el clado que agrupa éstos con *Cylindronenia* (0.977 de probabilidad posterior). Estos resultados son los más cercanos a lo obtenido usando el marcador 28S rRNA. Los datos concatenados fueron analizados exclusivamente mediante análisis de inferencia Bayesiana (Figura 42), usando estos dos marcadores a la vez se ha obtenido un patrón muy similar al obtenido con 16S rRNA pero con un mayor nivel de soporte en todos los nodos (97% en el nodo que junta a los *Andiniastra* y 100% en el que junta este grupo con *Cylindronenia*), estos resultados coinciden con lo obtenido mediante 28S rRNA y es un indicador positivo de su utilidad en futuras filogenias en Peruiniinae.

Análisis de Máxima Verosimilitud

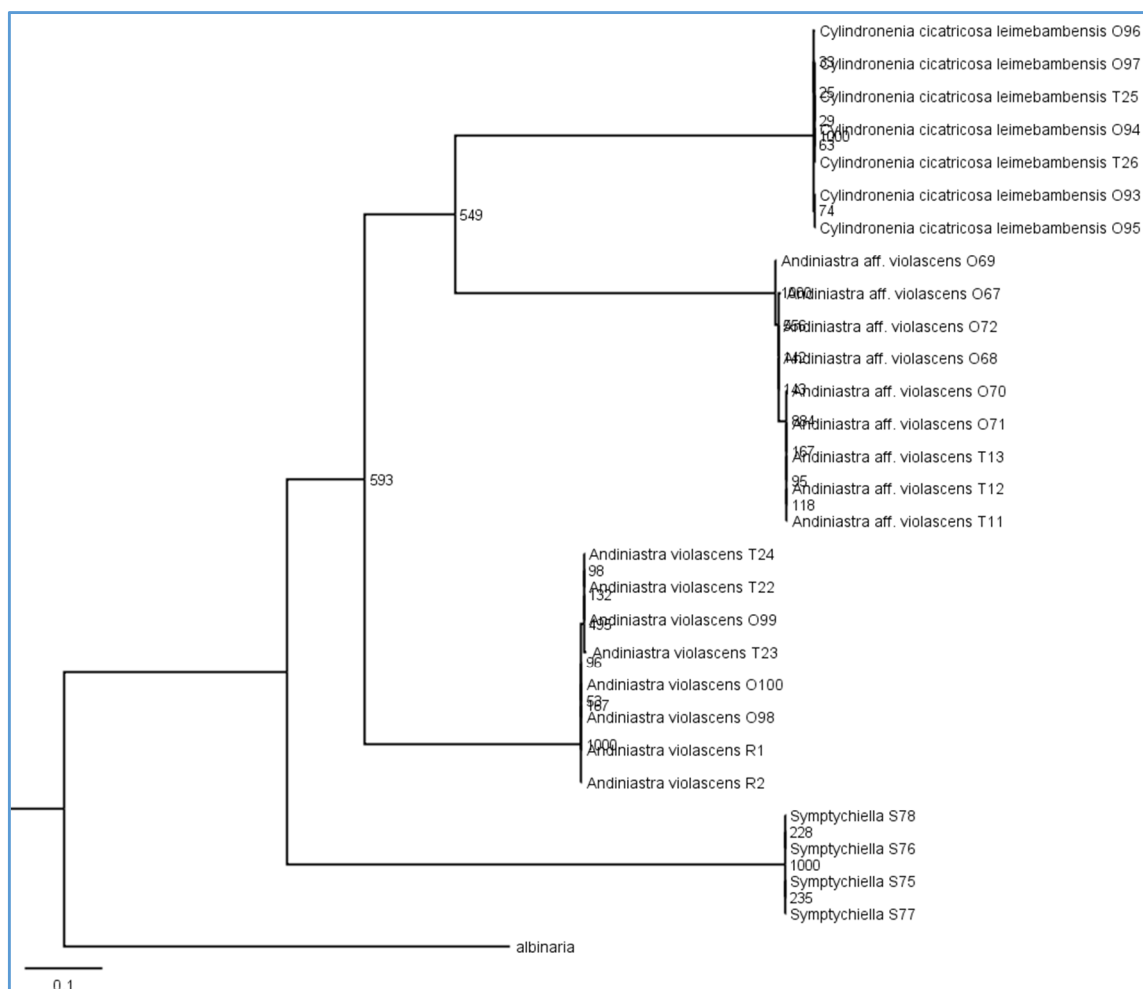


Figura 38. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) basado en el marcador mitocondrial COI. Realizado en PhyML con el modelo GTR+I seleccionado por el criterio AIC en JModelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* (1000 repeticiones).

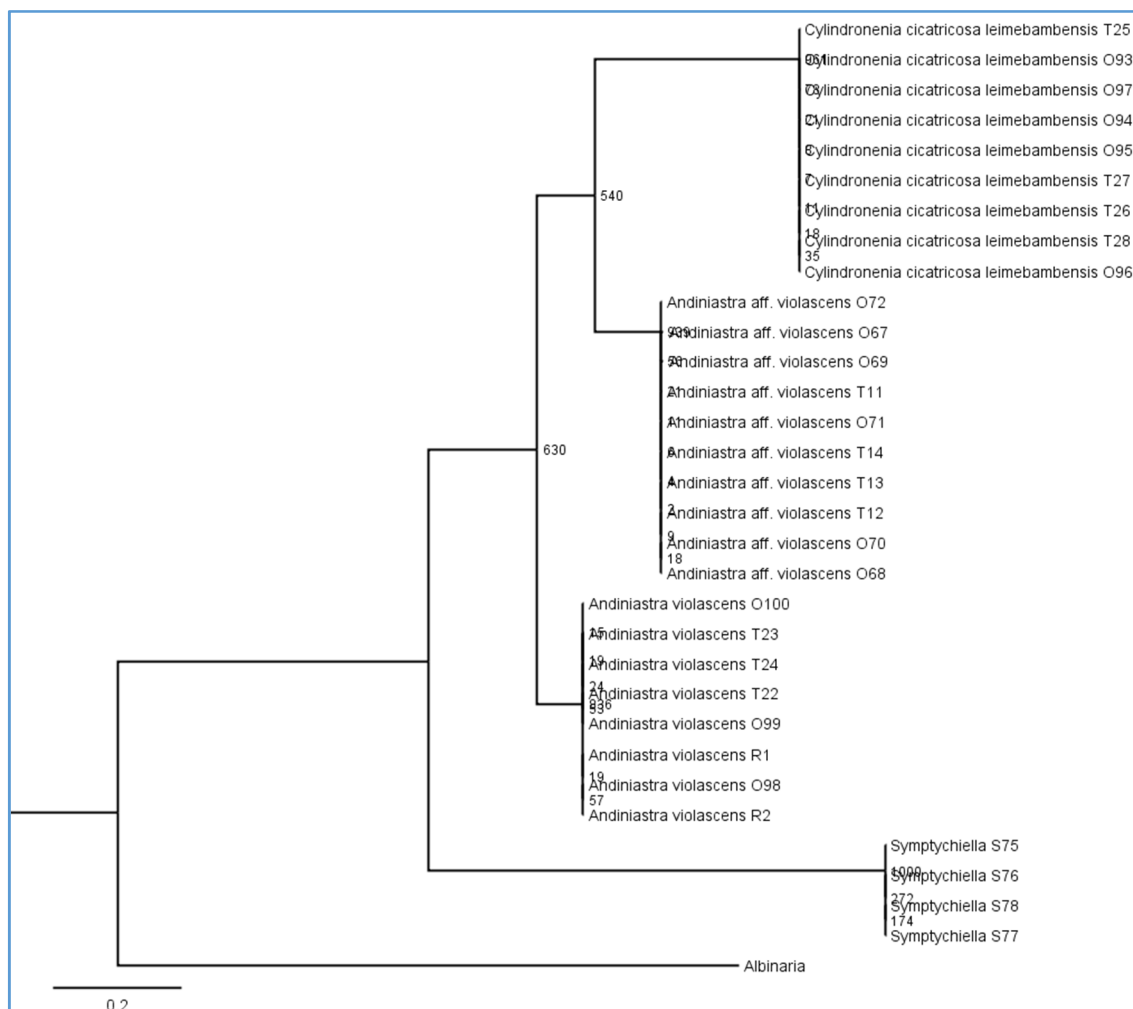


Figura 39. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) basado en el marcador mitocondrial 16S rRNA. Realizado PhyML con el modelo TPM2uf+G seleccionado por el criterio AIC en JmodelTest. Los números de cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* (1000 repeticiones).

Análisis de Inferencia Bayesiana

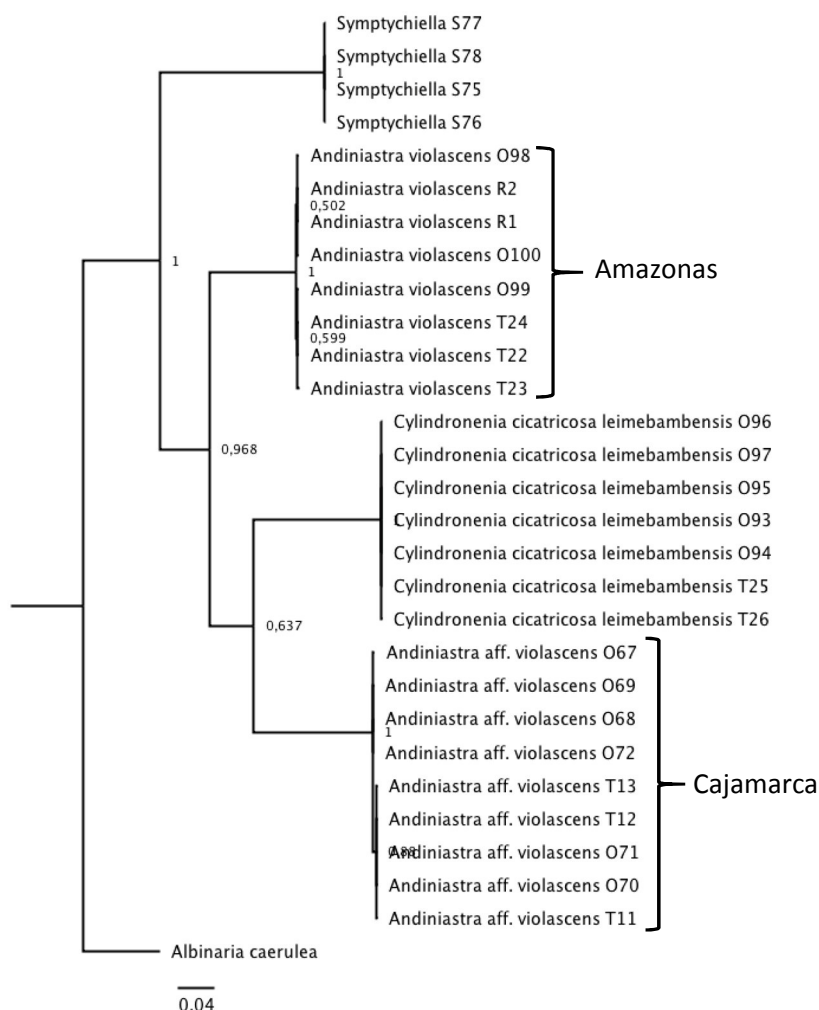


Figura 40. Árbol bayesiano (IB) basado en el marcador molecular COI usando MrBayes con el modelo SYM+G seleccionado por AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un burn-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.



Figura 41. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana (IB) basado en el marcador molecular 16S rRNA usando MrBayes con el modelo SYM+G seleccionado por AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un burn-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.

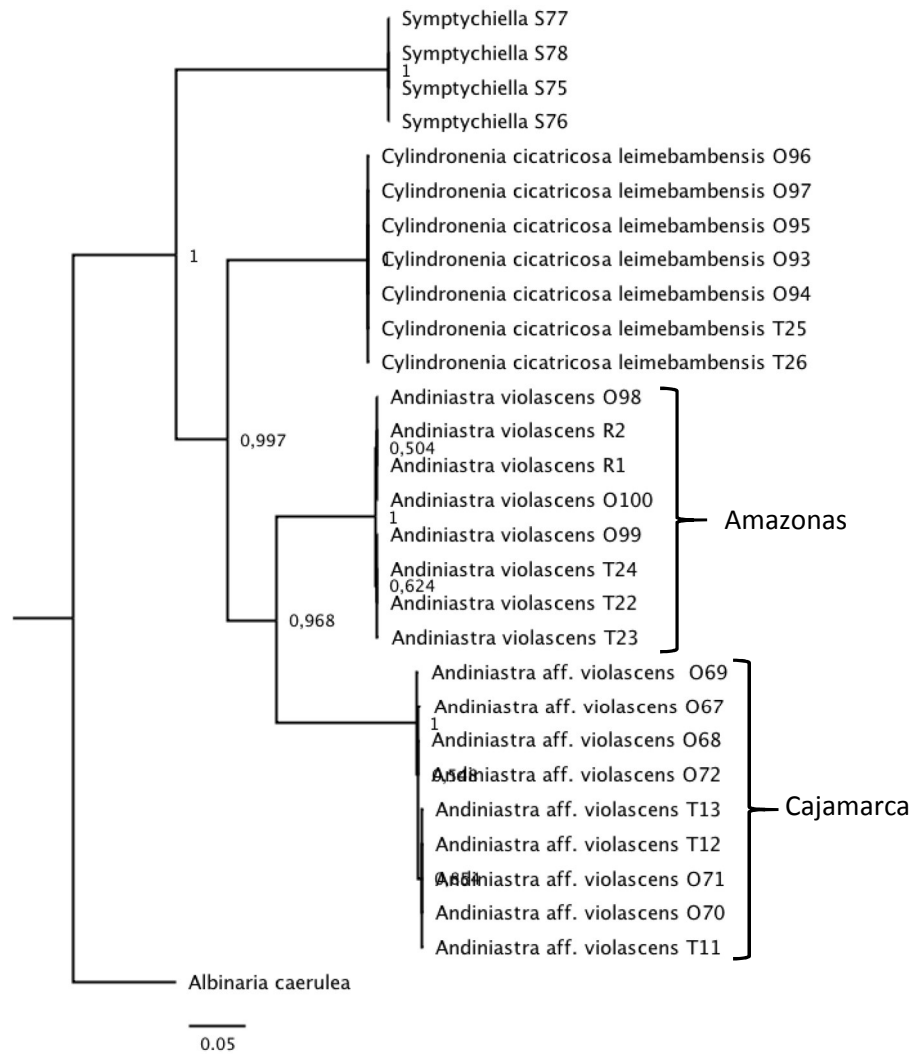


Figura 42. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana (IB) basado en los marcadores concatenados COI y 16S rRNA usando MrBayes bajo el modelo SYM+G seleccionado previamente para cada uno por el criterio AIC en MrModeltest. Los números de cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 1 millón de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un bur-in del 25% inicial de árboles generados. La escala representa la distancia genética. Los valores en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.

6.5 Diversidad intraespecífica en Peruiniinae

Se evaluó la diversidad intraespecífica de *Andiniastra violascens*, *A. aff. violascens*, *C. cicatricosa leimebambensis* y *Symptychiella sp.* utilizando los marcadores mitocondriales COI (Tabla 9) y 16S rRNA (Tabla 10). Los análisis de distancias revelaron muy poca diversidad en ambas poblaciones de *Andiniastra* y ningún nivel de diversidad dentro de las especies *Symptychiella sp.* y *C. (c) cicatricosa* en ambos marcadores, se puede ver los valores al detalle en el anexo nº1.

Tabla 9. Variación genética de 706 posiciones del marcador molecular COI realizado en MEGA7; N: número de secuencias; h: número de haplotipos; S: número de sitios segregantes; Ps: S/N; π : diversidad nucleotídica; θ : estadístico theta; Nd: No se puede determinar.

Espece	N	h	S	Ps	π	θ	D' Tajima
<i>A. violascens</i>	8	4	2	0.00283	0.001163	0.001093	0.241783
<i>A. aff. violascens</i>	9	4	5	0.00708	0.002990	0.002606	0.624961
<i>C. (C) leimebambensis</i>	7	1	0	0.00000	0.000000	0.000000	Nd
<i>Symptychiella</i>	4	1	0	0.00000	0.000000	0.000000	Nd
Total	28	10	223	0.31586	0.146754	0.081169	3.165139

Tabla 10. Variación genética de 332 posiciones del marcador molecular 16S realizado en MEGA7; N: número de secuencias; h: número de haplotipos; S: número de sitios segregantes; Ps: S/N; π : diversidad nucleotídica; θ : estadístico theta; Nd: No se puede determinar.

Espece	N	h	S	Ps	π	θ	D' Tajima
<i>A. violascens</i>	8	1	0	0.000000	0.000000	0.00000	Nd
<i>A. aff. violascens</i>	10	3	2	0.006024	0.001205	0.00213	-1.400851
<i>C. (C) leimebambensis</i>	9	1	0	0.000000	0.000000	0.00000	Nd
<i>Symptychiella</i>	4	1	0	0.000000	0.000000	0.00000	Nd
Total	31	6	126	0.379518	0.151095	0.09499	2.256402

Árboles por el método del vecino más cercano “Neighbor-Joining”

Los cladogramas realizados mediante el método del vecino más cercano (NJ) muestran que tanto con el marcador COI (Figura 43) como 16S rRNA (Figura 44), todos los individuos de una misma especie se agrupan con un buen nivel de soporte.

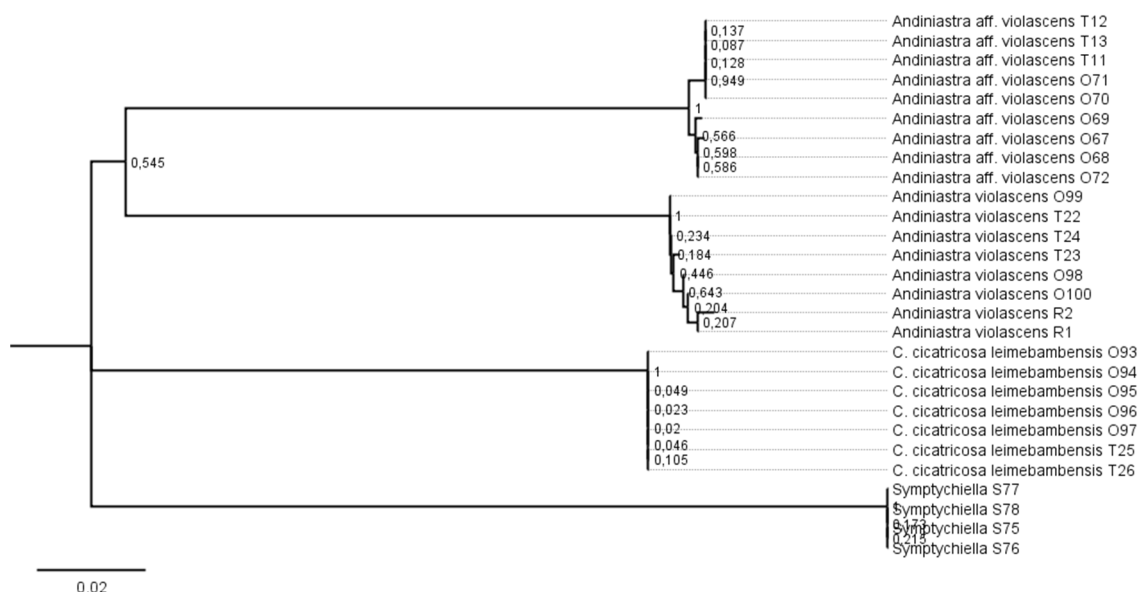


Figura 43. Árbol filogenético según el método del vecino más cercano (NJ) basado en la relación entre las secuencias del marcador COI obtenidas en este estudio. Los códigos de las muestras de ADN se encuentran al final del nombre de la especie.

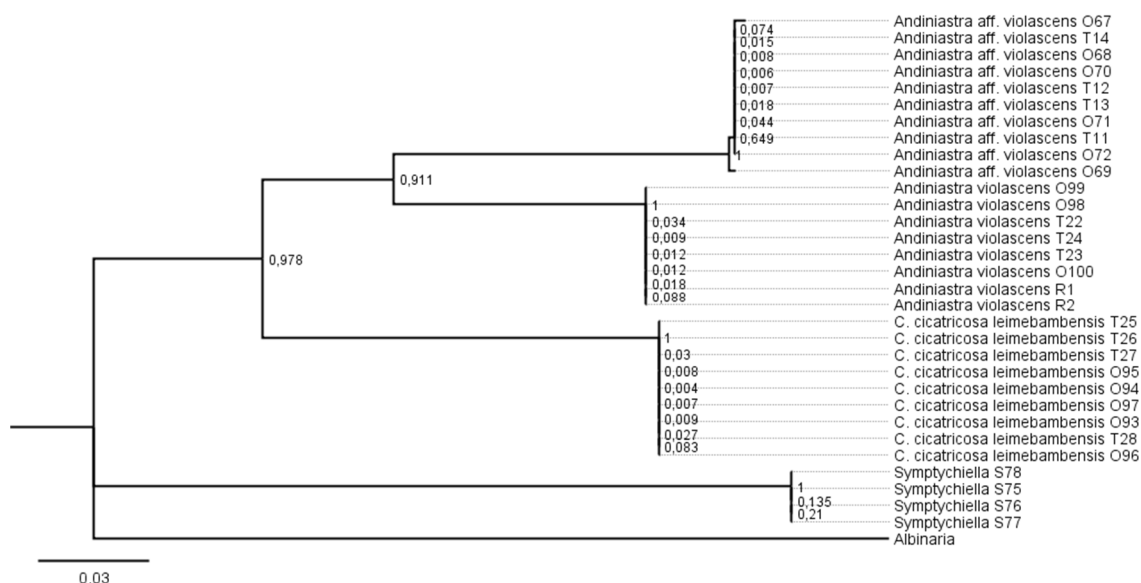


Figura 44 Árbol filogenético según el método del vecino más cercano (NJ) basado en la relación entre las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas en este estudio. Los códigos de las muestras de ADN se encuentran al final del nombre de la especie.

6.6 Código de Barras de ADN

Este estudio representa la primera evaluación molecular de códigos de barras de ADN de *Andiniastra violascens*, *Cylindronenia cicatricosa leymebambensis* y *Symptychiella sp.* Se obtuvieron un total de 28 secuencias de una porción del gen de citocromo C oxidasa (código de barras de ADN) pertenecientes a estas especies. Algunos análisis mostrados a continuación, como el cladograma circular (Figura 45), fueron realizados en la plataforma del Sistema BOLD en un proyecto privado, donde puedes almacenar y hacer análisis de las secuencias que no quieres liberar para público en general aún, otros análisis fueron realizados en MEGA7.

Códigos de Barras en el Sistema BOLD

El sistema BOLD genera códigos de barra ilustrativos de las secuencias en tu proyecto privado, además realiza otros análisis automáticos como el valor %GC, búsqueda de marco de lectura y traducción de la secuencia. En la figura 46 se ilustra la capacidad que tiene el marcador COI de generar un código de barras único para cada especie.

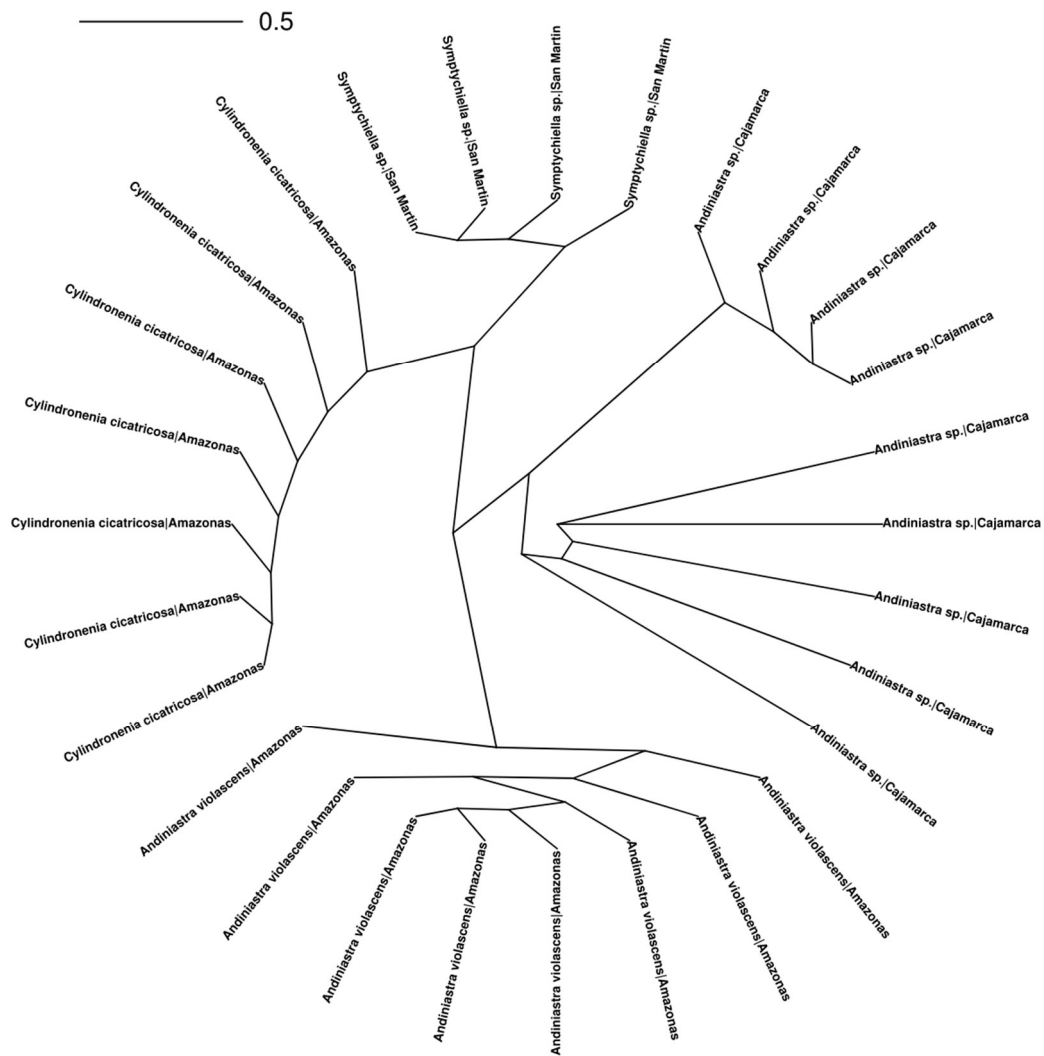


Figura 45. Cladograma circular por el método del Vecino más cercano (NJ) de las secuencias Nucleotídicas de COI bajo el modelo K2P. Obtenido en BOLD systems.

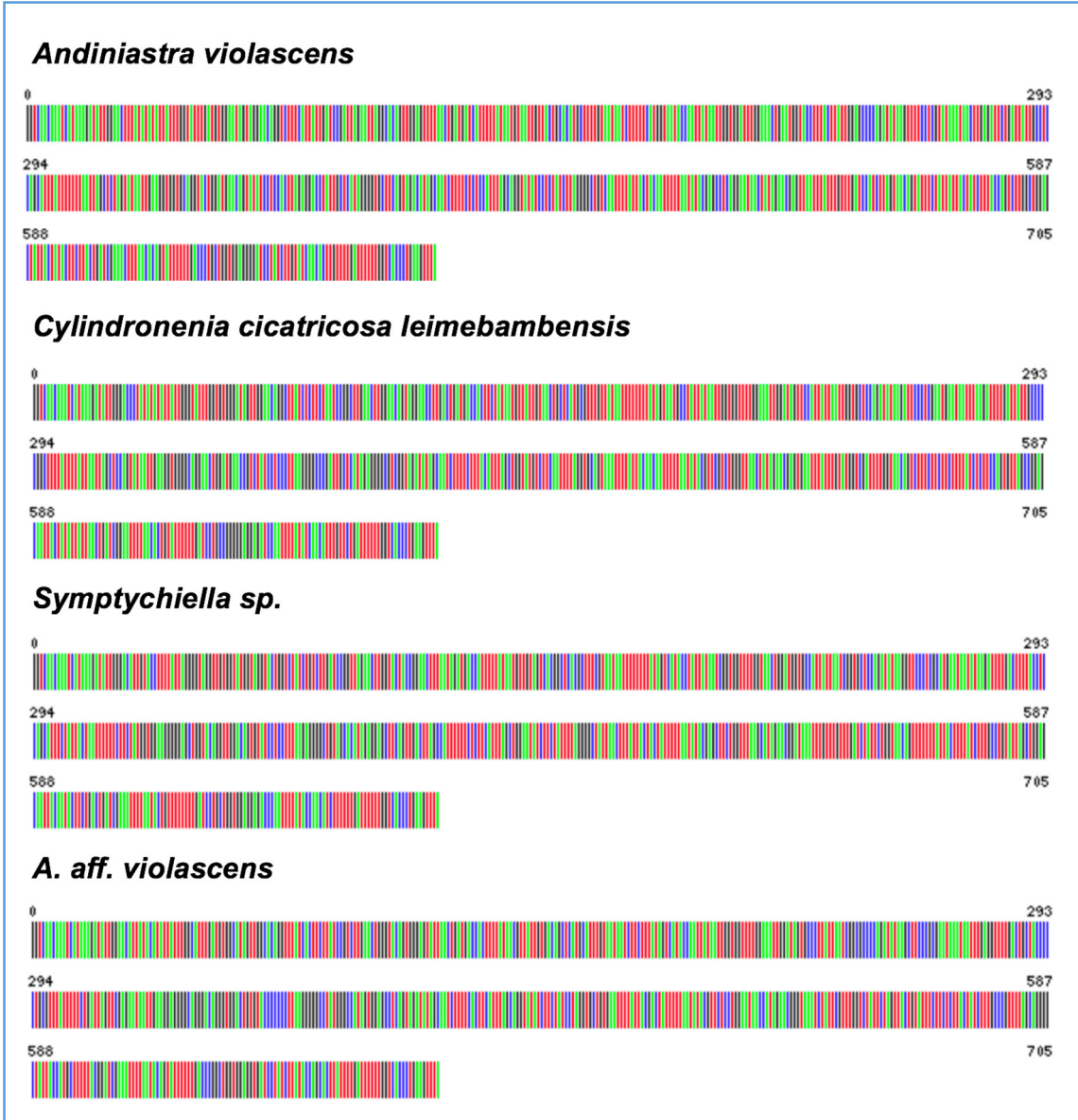


Figura 46. Códigos de Barras de las secuencias COI de Peruiniinae.

Distancias genéticas y brecha del código de barras

Se calcularon las distancias genéticas a pares dentro y entre especies utilizando el modelo de evolución K2P en el programa MEGA7 (Tabla 11). La distancia genética a pares promedio fue muy pequeña dentro de todas las especies en ambos marcadores (rango de 0.0 a 0.003), mientras que la distancia genética entre especies fue muy alta (de 0.16 a 0.33 en 16S y de 0.21 a 0.24 en COI). Además se evidenció la brecha del código de barras al constatar que la máxima distancia a pares encontrada dentro de una especie es menor a la distancia genética de esa especie con la especie más cercana (Vecino más cercano).

Tabla 11. Distancias genéticas y brechas en los códigos de barras. Se evidencia que la distancia genética a pares máxima dentro de una especie es inferior a la distancia genética de esa especie con la especie más cercana.

Marcador	Especie	Distancia Intra-específica promedio	Distancia Intra-específica máxima	Vecino más cercano (NN)	Distancia al NN
COI	<i>A. violascens</i>	0.001	0.003	<i>A. aff. violascens</i>	0.210
	<i>A. aff. violascens</i>	0.003	0.006	<i>A. violascens</i>	0.210
	<i>C. (c) cicatricosa</i>	0.000	0.000	<i>A. violascens</i>	0.211
	<i>Symptychiella</i>	0.000	0.000	<i>C. (c) cicatricosa</i>	0.249
16S	<i>A. violascens</i>	0.000	0.000	<i>A. aff. violascens</i>	0.161
	<i>A. aff. violascens</i>	0.001	0.006	<i>A. violascens</i>	0.161
	<i>C. (c) cicatricosa</i>	0.000	0.000	<i>A. violascens</i>	0.223
	<i>Symptychiella</i>	0.000	0.000	<i>A. violascens</i>	0.333

6.7 Divergencia entre *Andiniastra violascens* y *Andiniastra aff. violascens*

6.7.1 Diferencias aminoacídicas

Para hallar el marco de lectura de las secuencias se utilizó la herramienta de traducción de nucleótidos en el servidor en línea de ExPASy (www.expasy.org) donde se observó que el marco de lectura empezaba en la tercera posición 5'-3' ya que fue el único marco de lectura que no presentaba codones de fin de lectura o "stop" codon (Figura 47). La predicción de aminoácidos fue llevada a cabo en MEGA7 usando el código genético 5 de genoma mitocondrial de invertebrados y se obtuvo una secuencia de 234 aminoácidos (Figura 48).

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence.

5'3' Frame 1

GQQI Met K Met LELY Met Y Y L V F D V E Stop Stop EQVFHYWSD Stop N Stop AQLEF Stop L Met I I F Met Met Stop L L L H Met L L
Stop Stop S F S W Stop Y Q L Stop L V D L E T E W Y L L L E P Q Met Stop V F L V Stop Met T W D S D Y C L Q H L F F Stop L A L V Stop L K V V
Q V L D E Q Y I L H L E D L L L Met G V L Q Stop T Stop Q S F L S I Stop Q V Y P L S Stop G L S I L L L Q F L Met Y E P Q E Stop L Stop N E L I Y L
F D P S Stop Stop Q Y F Y Y Y Y L Y Q S W L E L L L Y F L L I E T L T Q Y F L T L L V E G I L S C I N T C F D F L V T L K F

5'3' Frame 2

V N K S Stop S Y W N F Met Y I I W Y L Met W N S S N S S F I D P I S I S H S W S E N W W S E L Stop C N C Y C T C F C N N L F H G N T N Y N W
W I W K L N G T F T Y W S P S Y K F S S Y K Stop L E I L I A S S I Y F F N Stop L Stop Y N W S W C S Y W Met N S Met S S T Stop S T Y C S Stop
G C F S S H S N L F S P F S S Y I L Y L S G C Q F Y Y Y N F Stop Y T S L S N N Y S T S Stop F I C L I H L S N S I S I I T I F T S L G W S Y Y Y T S Y
W S K L Stop H S I F W P C W W S G S Y L V S T L V L I F W S P W S L

5'3' Frame 3

S T N H K D I G T L Y Met L F G I W C G Met V G T G L S L L I R L E L G T V G V L T D D H F Y N V I V T A H A F V Met I F F Met V Met P I Met I G G F
G N W Met V P L L I G A P D Met S F P R Met N N L S F W L L P A F I L I S S S Met I E G G A G T G W T V Y P P L S G P I A H S G A S V D Met A I
F S L H L A G Met S S I L G A V N F I T I F N Met R A S G Met T Met E R V N L F V W S I L V T V F L L L S L P V L A G A I T Met L L T D R N F I
V F E D P A G G G D P I L Y Q H L F W F F G H P E V

3'5' Frame 1

Stop T S G W P K N Q N K C W Y K Met G S P P P A G S K N T V L K F R S V S S Met V Met A P A K T G K D S N S N T V T K Met D Q T N K L T R
S Met V I P E A R Met L K I V V Met K L T A P K Met E D Met P A K W S E K I A Met S T E A P L W A Met G P L S G G Y T V H P V P A P P S I Met L E
L I K K Met N A G G N N Q N L K L F Met R G K L Met S G A P Met S K G T I Q F P N P P I Met I G I T Met K K I T K A C A V T I L Stop K W S S V K
T P T V P N S N R I N N E S P V P T I P H Q Met P N N Met Y K V P Met S L W F V D

3'5' Frame 2

K L Q G D Q K I K T S V D T S Stop D P L H Q Q G Q K Met L C Stop S F D Q Stop E V Stop Stop L Q P S L V K Met V Met Met E Met L L L S W
K Q Met N Stop L V L Stop L F L S L V Y Stop K L Stop Stop N W Q P L S Stop S Met Y L L N G E K S L L C L L K H P Y E Q Stop V L Stop V E
D Met L F I Q Y L H H L Q L Y Stop S Stop L K K Stop Met L E A Met I S I S S Y L Y E E N L Y L G L Q Stop V K V P F S F Q I H Q L Stop L V L P W K
S L L Q K H V Q Stop Q L H Y K N D H Q L K L Q L C L I L I G S Met Met K D L F L L F H I K Y Q Met Met Y Met K F Q Y L Y D L L T

3'5' Frame 3

N F S V T K K S K Q V L Met Q D S I P S T S S V K K Y C V K V S I S K K Y S N S S S Q D W Stop S Stop Stop Stop K Y C Y Stop D G S N K
Stop I N S F Y S Y S W G S Y I K N C S N K I D S P Stop D S G Y T C Stop Met E S K D C Y V Y W S T P Met S N S S S K W S Met Y C S S T C T I
F N Y T S A N Stop K N K C W S Q Stop S E S Q V I Y T S K T Y I W G S N K Stop S Y H S V S K S T N Y N W Y Y H E K D Y Y K S Met C S N N Y
Met K Met I I S Stop N S N C A Stop F Stop S D Q Stop W K T C S Y Y S T S N T K Stop Y Met Stop S S N I F Met I C W

Figura 47. Búsqueda del marco de lectura de la secuencia de COI de *Andiniastra* en ExPASy. Se muestran los seis marcos de lectura, se puede observar muchos codones de término ("Stop") en todos salvo en el 5'-3' Marco de lectura 3 ("Frame 3").

El alineamiento de aminoácidos reveló cuatro cambios diagnósticos en la secuencia que diferenciaban a *A.violascens* de *A. aff. violascens* (detalles en la tabla 12) todos estos cambios fueron originados por transversiones en la secuencia nucleotídica, además de que existe un cambio de Timina por Citocina en la posición 603 que hace que haya un cambio en la secuencia proteica de Leucina (L) a Fenilalanina (F) en cinco de las nueve secuencias de *A. aff. violascens*.

Tabla 12. Cambios aminoacídicos diagnóstico en *Andiniastra* y los cambios nucleotídicos en las secuencias de COI que las originaron.

Posición	NUCLEÓTIDO		AMINOÁCIDO	
	<i>A. violascens</i>	<i>A. aff.violascens</i>	<i>A. violascens</i>	<i>A. aff.violascens</i>
492	G	T	Alanina (A)	Serina (S)
495	T	C	Serina (S)	Prolina (P)
383	T	G	Isoleucina (I)	Metionina (M)
386	T	C	Alanina (A)	Glicina (G)

✓1. ST-H12	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓2. ST-H13	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓3. ST-H11	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓4. ST-o70	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓5. ST-o71	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓6. ST-o67	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓7. ST-o68	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓8. ST-o72	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓9. ST-o69	S	G	P	M	G	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	S	P	G	M	T	M	E	R
✓10. LT-o98	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓11. LT-r2	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓12. LT-o100	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓13. LT-r1	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓14. LT-T22	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓15. LT-T24	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R
✓16. LT-T23	S	G	P	I	A	H	S	G	A	S	V	D	M	A	I	F	S	L	H	L	A	G	M	S	S	I	L	G	A	V	N	F	I	T	T	I	F	N	M	R	A	S	G	M	T	M	E	R

Figura 48. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *Andiniastra*. Se muestran los cuatro cambios diagnósticos resaltados en amarillo. ST: Santo Tomas (*Andiniastra aff. violascens*); LT: Localidad Tipo (*Andiniastra violascens*). Realizado en MEGA7.

6.7.2 Tiempos de Divergencia

Los tiempos de divergencia se obtuvieron en MEGA7 usando el árbol de máxima verosimilitud obtenido previamente en PhyML, y como punto de calibración secundaria se usó lo obtenido para Peruiiniinae por Uit de Weer & Gittenberger (2013) para el MRCA del clado (40.7 Ma: 25.6 – 57.4). *Andiniastra violascens* habría divergido de *A. aff. violascens* hace 12 millones de años (Figura 49).

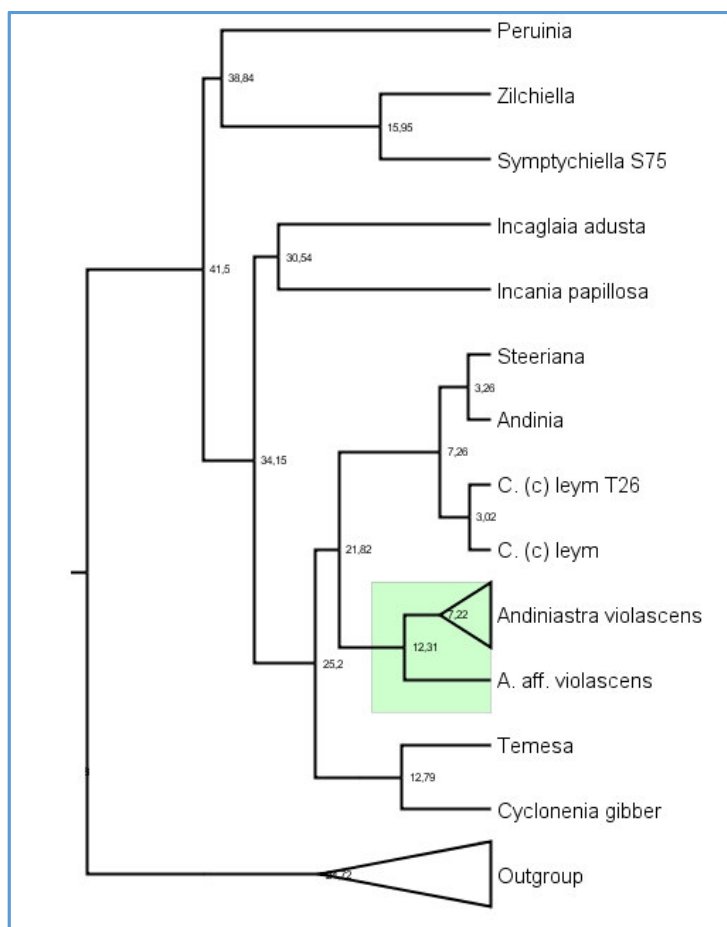


Figura 49. Árbol ML de 28S rRNA de Peruiiniinae y Tiempos de Divergencia. Los nodos representan el tiempo de Divergencia aproximado en Ma. En amarillo se resalta el clado de *Andiniastra*.

6.8 Estructura Secundaria de rRNA en Peruiniinae

Se realizó una primera evaluación de la estructura secundaria de un segmento de la subunidad 16S del gen ribosomal mitocondrial de *Peruiniinae* obtenidas en este estudio teniendo como referencia a la estructura secundaria de *Albinaria coerulea* (Lydeard *et al.* 2000). Todas las secuencias de los motivos evaluados son compartidas sin ninguna mutación entre individuos de una misma especie. El motivo F1 resultó diferente solo en *C. (C) leymeabambensis*, el motivo G2 fue compartido por ambos *Andiniastra* y las dos especies restantes mostraron su propio patrón (Figura 50), el motivo G6 fue diferente solo en *Symptychiella* (Figura 51), finalmente el motivo G7 muestra un patrón diferente para cada especie, siendo además el más variable de los motivos (Figura 51 y 52).

	110			120			150		
Aviolasceans LT	AAGG	TGAAAA	TTCC	TT			CCTAAGAG	TTTA	
AndvCAJ	AAGG	TGAAAA	TTCC	TT			CCTAAGAG	TTTA	
CLeym	AAAG	TGAAAA	TTCT	TT			CCTTAGAG	TTTC	
Symptychiella	AAGG	TGAAAA	TACC	TT			CCTTAGAG	TTTC	
Albinaria coerulea	TGAG	TGAAAA	TACT	CA			CCTTAGA	ATTTC	
	F1		F1'				G2		

Figura 50. Motivos F1 y G2 (parcial) de 16S rRNA de Peruiniinae y *Albinaria coerulea*. Estos motivos son altamente conservados. F1 y F1' son complementarios y se unen formando un tallo, la secuencia del medio forma un bucle.

Aviolasceus LT
AndvCAJ
CLeym
Symptychiella
Albinaria coerulea

The figure displays four RNA secondary structure diagrams, each showing two domains labeled G6 and G7. The nucleotides are represented by colored circles: red for Guanine (G), green for Cytosine (C), blue for Uracil (U), and yellow for Adenine (A). Red dots indicate base pairing. The structures are as follows:

- Andiniastra violascens:** G6 is a small domain with 8 nucleotides. G7 is a larger domain with 15 nucleotides, including a long internal loop.
- Andiniastra aff. violascens:** G6 is identical to the one in *A. violascens*. G7 is a larger domain with 16 nucleotides.
- C. cicatricosa leimebambensis:** G6 is identical to the one in *A. violascens*. G7 is a larger domain with 16 nucleotides.
- Symptychiella sp.:** G6 is identical to the one in *A. violascens*. G7 is a larger domain with 16 nucleotides.

84

6.9 Diferenciación morfológica de *Andiniastra* spp.

Andiniastra de Cajamarca fue nombrada como *Andiniastra aff. violascens* por que posee las características conchológicas del género *Andiniastra*, como su característica conchilla ligeramente degollada “decollated shell” y nervada. Además su lamela superior (sul) está continua con la lamela espiral (spl). Además, estaría relacionada a *Andiniastra violascens*, la única especie descrita en ese género (Nordsieck, 2005), sin embargo se encontraron algunas características resaltantes que las diferencian y por ello se le denominó como “*Affinis*”. La característica más resaltante que diferencia a *Andiniastra violascens* de Amazonas de *A. aff. violascens* de Cajamarca es la altura, *Andiniastra aff. violascens* con 32 mm (Figura 54) es más grande que *Andiniastra violascens* quien posee 22 mm (Figura 53). Incluso es más grande que el holotipo de *Andiniastra violascens*, muestra que tuvo el mayor tamaño de todas las presentadas por Nordsieck (2005). *A. violascens* tiene la conchilla de color violeta rojizo-marrón, lo que inspiró el nombre de la especie, mientras que *A. aff. violascens* tiene la conchilla de color violeta claro, ambas con estrías blancas o blanquecinas. Desde la vista frontal se puede observar que ambas poseen una lamella superior (sul) alta que conecta con la lamella espiral (sl), sin embargo, la lamella inferior (il) es más prominente, y por lo tanto evidente, en *A. aff. violascens*. En cuanto al clausilio, ambos son distalmente puntiagudos y en general son muy similares tanto en tamaño como en forma, sin embargo se puede observar que la placa de *A. aff. violascens* (Figura 55 - C) es notablemente más ancha que el de *Andiniastra violascens* (Figura 55 - D).

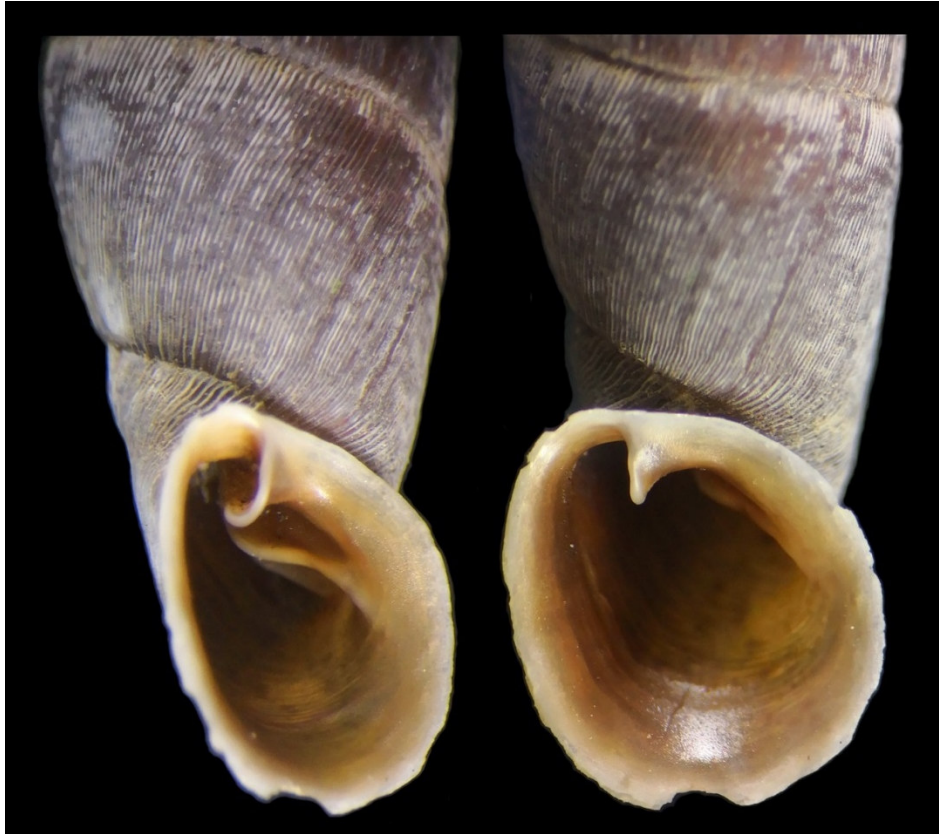


Figura 53. *Andiniastra violascens*. (Vista aumentada). AMAZONAS

Fotografía por Jaime Morín.



Figura 54. *Andiniastra aff. violascens*. (Vista Aumentada). CAJAMARCA

Fotografía por Jaime Morín.

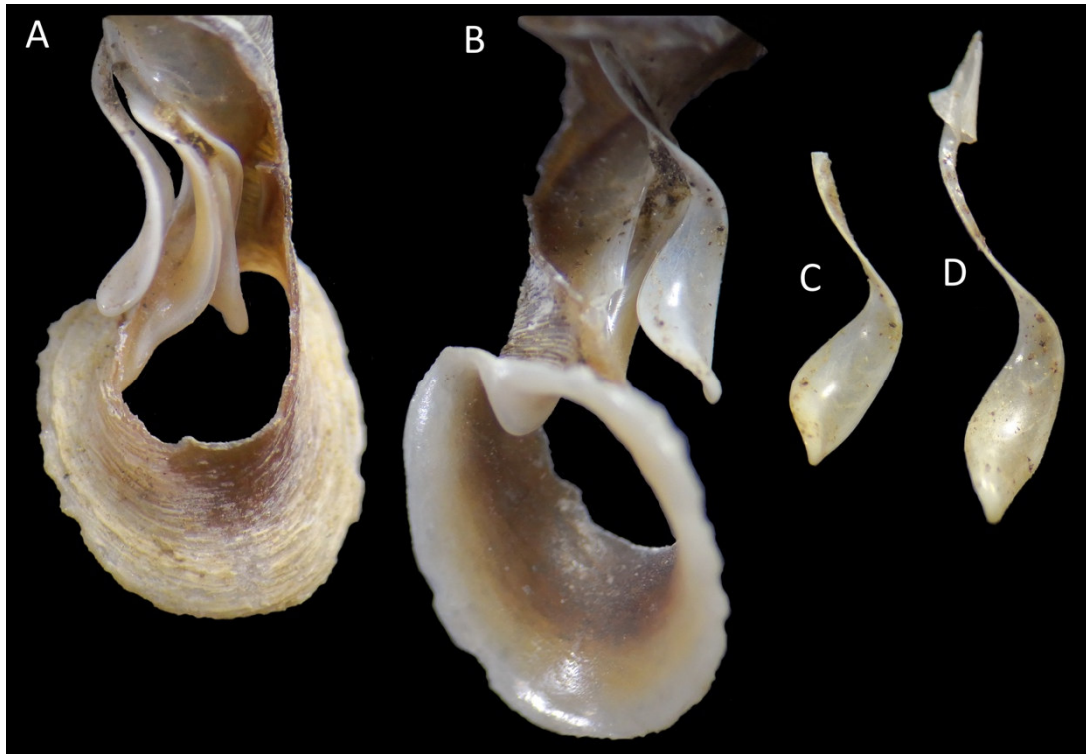


Figura 55. Estructura interna de *Andiniastra aff. violascens*, vista dorsal (A) y frontal (B). Clausilum de *Andiniastra aff. violascens* (C) y de *Andiniastra violascens* (D). Fotografía por Jaime Morín.

Las tomas de rayos X en *Andiniastra violascens* (Figura 56) fueron necesarias ya que se contó con poco material conchológico, mediante éstas pudimos obtener más información, sin dañar las conchillas, comparable con las tomas de rayos X de *Andiniastra aff. violascens* (Figura 57). Además, en la toma dorsal de ambas *Andiniastra* (Figura 58), se evidencia una diferencia en la morfología de la lunela, la cual se encuentra próxima a la plica principal en *A. violascens*, mientras que se aleja de ella en *A. aff. violascens*.

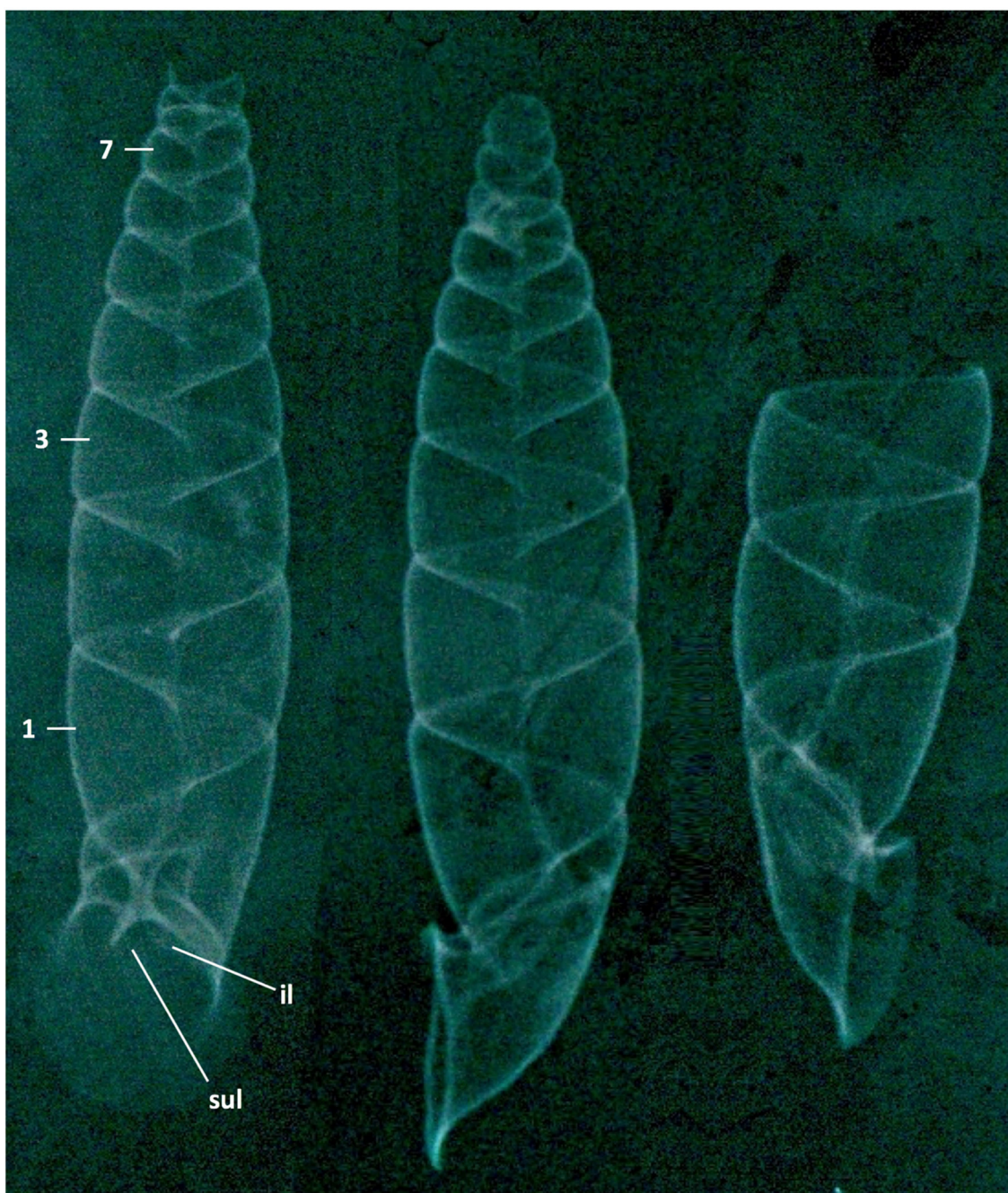


Figura 56. Rayos X en *Andiniastra violascens*. Vista frontal (izquierda) y laterales (centro y derecha). Se observa la lamela inferior (il) y superior (sul). 40 segundos de exposición



Figura 57. Rayos X en *Andiniastra aff. violascens*. Vista frontal (izquierda) y laterales (centro y derecha). Se observa la lamela inferior (il) y superior (sul). 40 segundos de exposición.

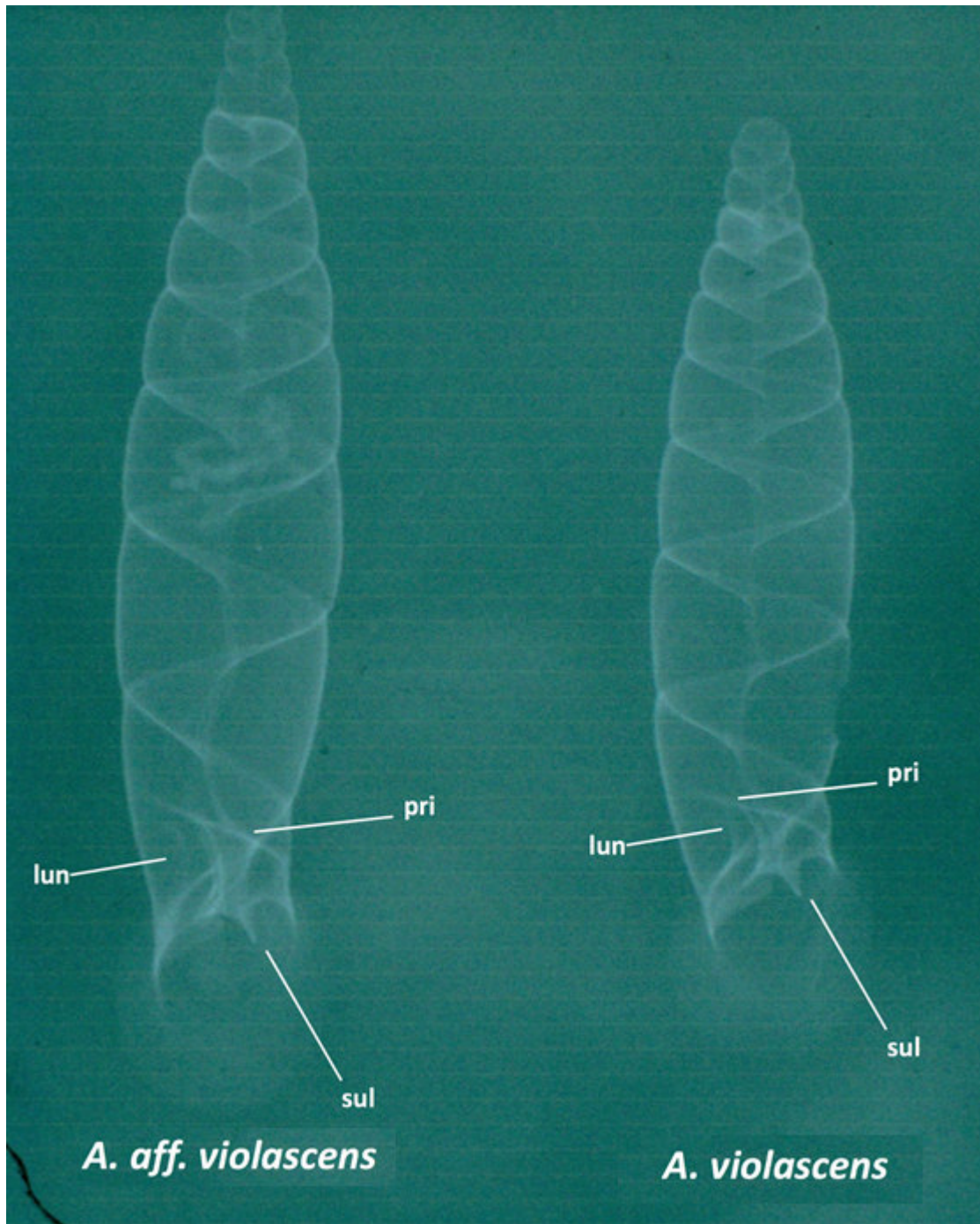


Figura 58. Rayos X de *Andiniastra violascens* (derecha) y *A. aff. violascens* (izquierda) en vista dorsal. 35 segundos de exposición. La forma de la lunela (lun) y plica principal (pri) es diferente en ambas poblaciones

7. DISCUSIÓN

7.1 Distribución limitada de *Andiniastra violascens* y el efecto del hombre en su hábitat

Las fotos presentadas de la localidad tipo de *Andiniastra violascens* fueron tomadas en el año 2017, se pudo evidenciar que la zona se encuentra muy próxima a la carretera hacia Chachapoyas, lamentablemente en la búsqueda de la expansión de esa carretera, muchos trabajos de dinamitado se han realizado en los alrededores, dejando muy pocos lugares intactos, lo que antes era vegetación se está convirtiendo en paredones que en varios tramos son, además, cementados. Esto hace que sea cada vez más difícil la recolección y estudio de estas especies que son endémicas, y recordando que los tres puntos de muestreo descritos (los del holotipo original y los organismos vivos de este estudio y las conchillas encontradas en este estudio) están dentro de un rango de 5 km aproximadamente, nos sugiere que esta especie podría tener una distribución restringida por lo que serían necesarios más estudios de índole biogeográfico.

Conocer la situación actual de esta especie es beneficioso para entender mejor el ambiente en el que habitan ya que debido a su baja vagilidad, los caracoles terrestres son ideales para estudios de vicarianza, de dispersión pasiva y como modelo para estudios de biogeografía de islas, además debido a su limitada tendencia a la dispersión, tienden a dejar huella en los patrones de distribución de especies y géneros, incluso en ausencia de barreras obvias (Uit de Weerd *et*

al. 2016). Sin embargo, la erosión del hábitad debido al hombre puede causar severas restricciones de flujo genético e incrementar la deriva genética aleatoria en caracoles (Dauda *et al.* 2018).

7.2 Extracción de ADN de muestras preservadas de Peruniinae

Las extracciones de ADN realizadas para este estudio se hicieron a partir de muestras de caracoles preservadas en alcohol de 95° que fueron colectadas en las expediciones en el marco de los proyectos de investigación del laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía. La concentración de ADN promedio obtenido fue de 102 ng/ul (min: 17 ng/ul, max: 293 ng/ul) y la calidad de ADN extraído (A260/280) cayó en el rango de 1.70 y 2.0 lo cual significa muy buenos niveles de pureza ya que este cociente debería estar alrededor de 1.8 según el manual. A pesar de haber obtenido buenos niveles de recuperación a partir de pequeñas piezas musculares de individuos preservados en alcohol 95%, se ha observado que en *Achatina fulicata* se ha logrado recuperar cantidades de hasta 2790 ng/μl usando una cantidad mucho menor de músculo extrayendo a partir de muestras frescas (Ayyagari *et al.* 2015), por lo que se recomienda hacer esto siempre que sea posible para poder obtener un mayor rendimiento de los mismos reactivos y esfuerzos.

7.3 Uso de MgCl₂ a 0.5M para amplificar el marcador 28S rRNA mediante los cebadores utilizados por Uit de Weerd & Gittenberger

Uno de los retos más grandes en la obtención de las secuencias de 28S rRNA fue el de su amplificación por PCR que puede deberse al contenido %GC, el cual es un problema largamente reconocido e incluso muchas veces la amplificación

de genes de este tipo no se puede realizar rutinariamente con técnicas normales de PCR (Kumar & Kaur 2014). En nuestro caso, se trató de amplificar los dos segmentos del marcador 28S rRNA usando los mismos cebadores descritos por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) ya que funcionaron en los *Peruiniinae* en los que ellos trabajaron, sin embargo en muchos de los casos se tuvo que recuperar el primer segmento del marcador (28S-I) mediante los cebadores LSU1-3 y LSU 2-4 (Wade & Mordan 2000). De igual manera antes de llegar a este punto se pudieron obtener algunos resultados positivos variando las condiciones de la PCR. Una alternativa de optimización del protocolo de PCR es el uso de aditivos tipo moléculas orgánicas en la mezcla de la reacción de PCR tales como dimetil sulfato (DMSO) o glicerol (Mammedov *et al.* 2008), pero preferimos comenzar con modificaciones que no involucren aditivos por lo que se realizó un ensayo utilizando diferentes condiciones de sal ya que es uno de los parámetros más fáciles de manipular y que tiene uno de los mayores impactos en los resultados de la reacción de PCR. Se sabe que en general la concentración final de $MgCl_2$ usado en una PCR puede ir desde 0.5 mM hasta 5 mM y que la recuperación de productos de PCR aumenta cuando se incrementa la concentración de Mg^{2+} pero en detrimento de la especificidad (Lorenz 2012). El cambio medular en el protocolo descrito por Ramirez (2004) usado de rutina en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía fue el de la concentración de $MgCl_2$ de 1.5mM a 0.5 mM concentración final y las nuevas temperaturas de hibridación utilizadas.

7.4 Alineamiento de COI, 16S rRNA y 28S rRNA con referencias para este último

Incongruencias en las filogenias de un grupo de estudio hecho por distintos autores pueden tener multiples orígenes, como un pobre o mal alineamiento, inclusión de secuencias que no reflejan fielmente la filogenia del organismo (por transferencia horizontal de genes o paralogía) o por el uso de modelos de evolución nucleotídica inadecuados (Simion *et al.* 2017). Solo caracteres homólogos pueden considerarse marcadores significativos en una genealogía, por lo que la precisión de una filogenia, u otro proceso bioinformático, basada en datos moleculares depende directamente de la calidad del alineamiento de secuencias (Kjer 1995), esto es especialmente dificultoso en alineamientos que presentan muchos indels (inserciones y deleciones). En nuestro caso, los alineamientos de COI, 16S rRNA y 28S rRNA mostraron pocos indels por lo que el alineamiento fue hecho de manera satisfactoria aún incluso en los alineamientos *de novo* de COI y 16S rRNA en los que no se contaba con una secuencia de referencia. Otra referencia importante fue que obtuvimos una secuencia de 28S rRNA de *C. (C) leimebambensis* ya que sí contamos con una secuencia de referencia en el GenBank de esta especie, lo que nos facilitó la examinación del alineamiento y la eliminación de posiciones muy variables o dificultosas que no fueron tomados en cuenta en los análisis realizados por Uit de Weerd & Gittenberger (2013), de esa manera aseguramos una correcta integración de nuestras secuencias en la filogenia mundial de Clausiliidae descritos por los autores mencionados.

7.5 Estructura secundaria de 16S rRNA de Peruiniinae

El ARN ribosomal es el constituyente principal del ribosoma y es fundamental para la construcción de proteínas en todas las formas de vida (Cheheda & Kumar 2014). Se sabe que el grado de conservación de la estructura secundaria del rRNA es mayor al de sus nucleótidos, por lo que se recomienda que la estructura secundaria se use como guía al momento de asignar posiciones homólogas para estudios filogenéticos (Kjer 1995). Los resultados presentados en este trabajo son las primeras bases para el estudio de la estructura secundaria de ARN ribosomal mitocondrial en Peruiniinae ya que no existe, para este grupo, ninguna secuencia del marcador 16S rRNA en las bases de datos o trabajos previos.

Para realizar esta primera evaluación, seguimos las notaciones y metodología descrita por Ramirez & Ramirez (2010) que es el único trabajo de este tipo realizado para caracoles peruanos que incluyen 5 géneros de Orthalicidos. Se evaluaron nuestras secuencias por homología a la estructura secundaria de *Albinaria caerulea* (Lydeard *et al.* 2000), se examinó específicamente el motivo F1 y los motivos G2 (parcial), G6 y G7 del dominio V, ya que estos presentaban un alto índice de conservación.

Se encontró que aun teniendo una alta tasa de variación molecular, las secuencias mostraban muchos sitios conservados en las secciones de rRNA estudiadas, lo que es consistente con lo encontrado por Ramirez & Ramirez (2010), además que cuando la variación era comparativamente mayor, como en G7, las mutaciones admitidas logran mantener la estructura secundaria y es posible que esta tendencia se mantenga en los demás Peruiniini. Es necesario destacar que nuestra familia de estudio es la misma que la de la especie de

referencia, por lo que se facilitaría la evaluación en secciones más dificultosas de la secuencia.

Las secuencias de ADN de todos los motivos salvo G7 fueron compartidos con muy pocas mutaciones entre todos los Clausiliidae peruanos, se observó que el motivo más variable es el G7 con un bucle que va desde 8 a 11 pares de bases. Todos estos motivos fueron 100% compartidos dentro de cada especie y cabe resaltar que se encontraron diferencias entre *Andiniastra violascens* y *Andiniastra aff. violascens*.

7.6 Código de barras de ADN

El uso de los códigos de barras de ADN está entrando a una nueva fase de aplicación ya que cada vez son más las investigaciones que se suman al uso de estos marcadores estandarizados para resolver preguntas relacionadas a la ecología y evolución de sistemas naturales y se está probando su utilidad para entender las fronteras de especies y conservación de la biodiversidad (Kress *et al.* 2014). En este sentido es importante que en Perú se genere información molecular comparable a lo que el resto del mundo está produciendo. Como código de barras se ha propuesto y usado como marcador estándar a un segmento del gen mitocondrial del citocromo oxidasa C subunidad I (COI), este segmento ha sido secuenciado en este trabajo en compañía del gen 16S del ARN ribosomal ya que ha sido demostrado que es un marcador que posee un nivel comparable o superior de sitios informativos en grupos como anfibios e Hydrozoa, y específicamente en moluscos ha sido de mucha utilidad para resolver relaciones poblacionales y resolver relaciones filogenéticas a nivel de especies o categorías superiores (Ramírez *et al.* 2012).

En BOLD System (<http://www.boldsystems.org/>) se encuentran depositados un total de 829 secuencias de COI provenientes de 133 especies de Clausiliidae, mientras que en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) existen registros de 849 secuencias de COI y 685 de 16S rRNA para este grupo. Sin embargo, en ninguna de las dos bases de datos se encontraron registros de Clausiliidae Americanos. El presente trabajo presenta los primeros resultados en la búsqueda de generar una biblioteca de códigos de barras en el continente, la cobertura de géneros lograda representó en total a 3 de los 27 géneros descritos para Sudamérica.

Uno de los problemas principales que se puede encontrar al emplear los códigos de barras es obtener poca resolución en los marcadores moleculares empleados, dificultando la discriminación de los taxa estudiados, esto se debe en parte a lo variable que es la definición de especie entre los linajes mayores que existen (Kress *et al.* 2014) y la naturaleza de los caracteres tradicionalmente usados para la descripción de sus especies. De esta manera, para conocer el poder resolutivo de un marcador como código de barras de un grupo es necesario una buena cobertura de las especies y géneros que abarcan. En nuestro caso, cada especie estudiada de la subfamilia Peruiniinae presentó un código de barras único con pocas variaciones dentro de la especie (variación cercana al 0%), además, la distancia genética promedio entre las secuencias de COI de una especie con su vecino más cercano en Peruiniinae resultó en 22%, este valor podría ser usado como una referencia para delimitar especies dentro de este grupo, aunque siempre es posible que este valor varíe un poco dentro de cada uno de sus géneros ya que se ha encontrado que el tamaño de la brecha de código de barras depende fuertemente del grupo taxonómico (Candek &

Kuntner 2015). Además, hay que tener en cuenta que la evaluación de la diversidad no solo debe tener en cuenta la información molecular sino que debe ir de la mano con estudios morfológicos hechos por taxónomos expertos para evitar errores como la sobre estimación de la riqueza de especies (Zhang *et al.* 2017). Por otra parte, se encontró una diferencia de 21% entre los códigos de barras de los dos grupos de *Andiniastra* (*Andiniastra violascens* y *Andiniastra aff. violascens*) lo que es suficiente para darnos un indicio de que es posible asignar sin dudas un código de barras único para cada especie en Peruiniinae.

7.7 Posición evolutiva de *Andiniastra* y *Symptychiella* en la subfamilia Peruiniinae y tiempos de divergencia

Los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) basado en 28S rRNA revelaron que *Andiniastra violascens* y *A. aff. violascens* están más cercanamente relacionadas con el clado conformado por *Cylindronenia*, *Steeriana* y *Andinia* (género al que *Andiniastra* fue asignado inicialmente; Nordsieck 2005) que con otros clados o géneros dentro de la subfamilia Peruiniinae. Además, se reveló que *Symptychiella* está más relacionado a *Zilchiella* que a los demás géneros de Peruiniinae.

Cabe resaltar que las ligeras diferencias en las topologías que hemos obtenido con lo realizado por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) se puede deber a que nos basamos en secuencias de 28S rRNA únicamente, mientras que ellos también utilizaron secuencias de las histonas H3 y H4, pero también es posible que las topologías difieran debido a la nueva información genética generada. En general encontramos los mismos dos grupos en Peruiniinae, uno conformado por *Peruinia*, *Zilchiella* y con la nueva adición *Symptychiella*, y otro grupo

formado por el resto de secuencias, dentro de este último grupo, el clado conformado por *Cylindronenia*, *Andinia*, *Steeriana* y *Andiniastra*, pasó a estar dentro del clado conformado por *Cyclonenia* y *Temesa*, clados que antes estaban separados.

Una gran variedad de especies y sub especies de *Symptychiella* fueron descritas en unas zonas cercanas entre San Martín (cerca y al norte de Rioja) y Amazonas (al sureste de Chachapoyas) por Nordsieck en el año 1999, 2005 y 2010 basándose en evidencia morfológica de las conchillas colectadas previamente. Sin embargo no se ha realizado, hasta el presente trabajo, ningún estudio que implique marcadores moleculares por lo que aún queda mucho terreno por explorar en este campo. Además, originalmente *Symptychiella* fue considerada como un género que no encajaba en la entonces familia Neniinae que englobaba a los Clausiliidae del nuevo mundo, esto debido principalmente a la forma de su apertura que era no apostrófica, así que siendo el único género que presentaba esta característica se asumió que en esta parte del continente (Sudamérica) existían dos linajes evolutivos: Los Neniinae apostróficos (apertura en forma de apóstrofo) y los Neniinae no apostróficos (Norsieck 1999), lo que significaba que Sudamérica habría sido colonizado dos veces por grupos no cercanamente relacionados. Nuestros resultados basados en evidencia molecular nos dicen que, a pesar de que este tipo de carácter morfológico es uno de los más confiables para separar grupos de Clausiliidae, no lo es en este caso, ya que se ha demostrado que *Symptychiella* sí pertenece a la subfamilia Peruiniinae y que por lo tanto este tipo de apertura habría evolucionado en algún punto a partir de un Peruiniinae apostrófico, siendo entonces un carácter homoplásico.

Las filogenias obtenidas basandose en el marcador 16S rRNA estuvieron más cercanas a lo encontrado usando 28S rRNA que a la filogenias basadas en COI. Esto se debe a que el marcador COI presentó saturación, usualmente COI es un marcador hipervariable y se utiliza para identificación de especies y subespecies mientras que 16S rRNA se utiliza en filogenias de categoría media, o sea, a nivel de familia (Arif & Khan 2009)

Se ha estimado que Peruiniinae, subfamilia que agrupa a los Clausiliidae sudamericanos (considerada subtribu hasta ese momento), es uno de los clados más antiguos de la familia Clausiliidae, siendo 40.7 millones de años (intervalo 25.6 – 57.4) la edad media de su ancestro común más reciente (Uit de Weerd & Gittenberger 2013). Esta información nos ha permitido realizar una calibración secundaria que nos dio como resultado un tiempo de divergencia aproximado de 12.3 millones de años entre las poblaciones de *Andiniastra* encontradas a ambos lados del río Marañón, *A. violascens* en el departamento de Amazonas y *Andiniastra aff. violascens* en Cajamarca. El levantamiento de los Andes empezó hace 50 millones de años con una cronosecuencia de Oeste a Este y de Sur a Norte por lo que la cordillera del este involucraría los cambios más recientes (Reynel *et al.* 2013). Sin embargo, la mayor parte del levantamiento de los Andes empezó hace 25 millones de años, intensificandose entre hace 10 y 5 millones (Antonelli & Sanmartín 2011). Todo parece indicar que ambas poblaciones de *Andiniastra* compartieron un ancestro común cuando la elevación de los Andes no era muy evidente y fue esta elevación uno de los factores más importantes en la diversificación de este género.

7.8 Posición taxonómica de *Andiniastra aff. violascens*

Inicialmente este estudio se centró en la especie endémica *Andiniastra violascens* de Amazonas, única especie del género. Sin embargo, luego se encontró una población de *Andiniastra* a 86 km de la localidad tipo en Cajamarca, a la que se denominó *Andiniastra aff. violascens*. En las siguientes secciones se discute la evidencia que respalda las diferencias morfológicas inicialmente encontradas entre las dos *Andiniastra*, sugiriendo que *Andiniastra aff. violascens* podría ser una especie diferente que no se encuentra actualmente descrita.

Distancia Genética

La distancia genética bajo el modelo 2-parámetros de Kimura entre *Andiniastra violascens* colectado de la localidad tipo en Amazonas y *Andiniastra aff. violascens* proveniente de Cajamarca, es de 21% en COI y 16.1% en 16S. Si bien nos falta referencias en cuanto a este tipo de estudios en Peruiniinae, nuestros resultados pueden compararse con algunos de los múltiples estudios hechos en la subfamilia Alopiinae, por ejemplo en el género *Alopiia* se ha observado una divergencia máxima entre sus especies de 13% (Fehér *et al.* 2013) para COI, mientras que en *Albinaria* se ha observado una divergencia de entre 14 – 17.6 % para COI y 5.3 – 9.3 % para 16S rRNA (Kornilios *et al.* 2015) y valores de entre 12 y 18% para COI en otro grupo del mismo género (Pall-Gergely *et al.* 2012). En otros grupos como en el género *Micropontica* (Baleinae: Clausiliidae) se han visto valores más bajos teniendo una divergencia máxima entre especies 7.8 – 8.9% para COI y 6.3 – 6.7% para 16S rRNA. (Koch *et al.* 2016). Como se puede ver, la diferencia genética de las dos poblaciones de *Andiniastra* es alta, superando la diferencia genética intraespecífica encontrada en otros estudios de Clausiliidae. Además, en nuestro estudio se observó valores

similares de divergencia entre géneros de Peruiniinae (21.1% entre *Andiniastra* y *Cylindronenia*).

Aminoácidos deducidos de la secuencia de COI

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas predecidas de las secuencias COI de *Andiniastra* revelaron dos patrones diferentes en *A. violascens* y *A. aff. violascens*, observando un total de 4 cambios entre ellos y que eran compartidos por todos los individuos de cada grupo sin excepción. Estas diferencias muestran una alta divergencia entre estos dos grupos, la suficiente como para pensar que estamos frente a dos especies diferentes. Podemos comparar esto con el género *Alopi*, que es el caso más cercano que podemos encontrar, donde se observó una variación total de 31.4% en 69 haplotipos y, sin embargo, la mayoría de estas variaciones no afectaban la secuencia aminoacídica deducida, salvo una mutación que causaba un cambio de prolina por alanina en 11 haplotipos y otros siete cambios únicos vistos en siete distintos haplotipos (Fehér *et al.* 2013).

En cuanto a la implicancia biológica de estos cambios aminoacídicos, sabemos que nuestra secuencia de nucleótidos codifica al citocromo c oxidasa subunidad I (COX1), que es una de las tres subunidades que conforman el complejo respiratorio IV (núcleo catalítico) de la enzima citocromo c oxidasa (Timón-Gómez *et al.* 2018). Al hacer una comparación en el servidor en línea UnitPro de nuestra secuencia con la secuencia aminoacídica anotada de *Albinaria caerulea* (P48887) vemos que los cambios que hemos encontrado no están en sitios de unión a metales, sin embargo, es posible que estos cambios puedan influenciar en algún grado, de manera directa o indirecta, en las funciones de la enzima.

Diversidad de hábitats de *Andiniastra* spp.

Los hábitats que estos dos grupos de *Andiniastra* ocupan, son muy diferentes, no solo están separados por 86 Km de distancia, sino que mientras *Andiniastra violascens* de Amazonas habita a aproximadamente 1433 msnm en lo que se conoce como Bosques Tropicales Estacionalmente Secos (BTES), *Andiniastra aff. violascens* habita a 2076 msnm en los Bosques Nublados de Cajamarca.

El levantamiento de los Andes puede incrementar la diversificación de especies en muchas formas como, por ejemplo, el incremento de la heterogenidad de hábitats, favoreciendo así la radiación adaptativa. Además, también puede actuar favoreciendo la proliferación de especies “pre-adaptadas” a condiciones de montañas, así como influir en la especiación alopátrica debido al aislamiento generado por la formación de valles profundos y también puede tener un rol en la generación de vicarianza geográfica entre las poblaciones de ambos lados de la base de las montañas emergentes (Antonelli & Sanmartín 2011). *Andiniastra aff. violascens* se distribuye en la cordillera central, mientras que *Andiniastra violascens* se encuentra en la cordillera oriental, debido a la poca vagilidad de los caracoles terrestres y a las barreras geográficas; lo más probable es que ambos grupos de *Andiniastra* provengan de un ancestro común que se dividió en dos linajes debido al levantamiento de la cordillera que empezó hace 50 millones de años (Reynel *et al.* 2013).

8. CONCLUSIONES

- *Andiniastra violascens* pertenece a la Subfamilia Peruiniinae, esto está basado en los análisis bayesianos y de máxima verosimilitud del marcador molecular 28S rRNA. Además, se encuentra cercanamente relacionada al clado conformado por *Cylindronenia*, *Steeriana* y *Andinia*.
- *Symptychiella* sí pertenece a la subfamilia Peruiniinae, esto basado en el marcador molecular 28S rRNA, por lo que la apertura no apostrófica habría aparecido *de novo* dentro del linaje con apertura apostrófica que colonizó por única vez a Sudamérica y no provendría de una segunda colonización de un linaje no apostrófico.
- *Andiniastra violascens* muestra una divergencia comparativamente alta con *A. aff. violascens* tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico, además poseen hábitats de diferentes características, lo cual no se encuentra descrito.
- La divergencia de ambas especies de *Andiniastra* fue hace aproximadamente 12.3 millones de años y la divergencia del género estaría influenciada directamente con el levantamiento de la cordillera de los Andes alrededor de ese periodo.
- Cada especie de Peruiniinae estudiada mostró su propio código de barras mediante el marcador COI.
- La amplificación de las secuencias de 16S rRNA y COI se pudo realizar siguiendo el protocolo y ciclaje descrito por Ramírez (2004), sin embargo fue necesario una modificación de la concentración final de $MgCl_2$ de 1.5 mM a 0.5 mM para poder obtener amplicones de 28S rRNA.

9 RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos más intensivos de *Andiniastra violascens* en el departamento de Amazonas con el fin de obtener muestras de organismos vivos pertenecientes a diferentes poblaciones para poder realizar análisis más profundos a este nivel. Además, tener en cuenta que el avance de la civilización está, probablemente, deteriorando su hábitat a una velocidad acelerada.
- Revisar la situación taxonómica de *Andiniastra aff. violascens* ya que nuestros estudios sugieren divergencia suficiente como para ser considerada una especie separada (la segunda especie del género).
- Realizar muestreos en San Martín y Amazonas para recolectar individuos vivos de las diferentes especies de *Symptychiella* descritas para poder develar su situación poblacional y relaciones filogenéticas utilizando marcadores moleculares.
- Para la amplificación de los dos segmentos del marcador 28S rRNA mediante los cebadores utilizados por Uit de Weerd & Gittenberger (2013) se recomienda utilizar una modificación al protocolo descrito por Ramirez (2004) utilizando una concentración de $MgCl_2$ de 0.5 mM y a partir de allí, realizar ensayos de temperatura de hibridación desde los 50°C hasta 54°C.
- Para una mejor calidad en la extracción de ADN se recomienda que al sacrificar los individuos se guarde 1 o 2 mm³ de tejido muscular de los caracoles en alcohol y refrigerarlos hasta el momento de la extracción de ADN, si es que no se planea realizar la extracción en ese momento.

- Es necesario el aumento de información molecular de este tipo para estudios filogenéticos más finos y para estudios de genética de poblaciones.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonelli A. & I. Sanmartín. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics?. *Neotropical Plant Evolution*, Taxon 60 (2): 403 – 414.

Arbeláez-Cortés E., B. Milá, & A.G. Navarro-Sigüenza. 2014. Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 70: 362 – 377.

Arif A. & H. Khan. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32 (1) : 9 – 17.

Avise J. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.

Ayyagari V., J. Naravula & K. Sreerama. 2017. Optimization of the isolation procedure of genomic DNA from a mucus laden pulmonate gastropod, *Achatina fulica*. *National Academy Science Letters*. 40 (2): 109 – 112.

Candek K. & M. Kuntner. 2015. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*. 15: 268 – 277.

Chazot N., K. Willmott, A. Freitas *et al.* 2016. Patterns of Species, Phylogenetic and mimicry diversity of clearwing butterflies in the Neotropics. In: Pellens R. & P. Grandcolas (eds) *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Topics in Biodiversity and Conservation*. 14: 333 – 354.

Chheda N. & M. Kumar. 2014. RNA as Permutation. arXiv:1403.5477v1, q-bio.BM

Collins R. & R. Cruickshank. 2012. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*. 13(6): 969 – 975.

Dauda A., B. Okon & L. Ibom. 2018. Genetic Diversity of Giant African Land Snails (GALS). *Proceedings of 6th NSCB Biodiversity Conference, Uniuyo*. 144 – 147

Elejalde M., M. Madeira, J. Arrébola *et al.* 2008. Molecular phylogeny taxonomy and evolution of the land snail genus *Iberus* (Pulmonata: Helicidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46(3): 193 – 202.

Excoffier L. & Lischer H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform Population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564 – 567.

Fehér Z., L. Németh, A. Nicoara & M. Szekeres. 2013. Molecular phylogeny of the land snail genus *Alopi*a (Gastropoda: Clausiliidae) reveals multiple inversions of chirality. *The Linnean Society of London, Zoological Journal of the Linnean Society*. 167: 259 – 272.

Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*. 125 (1): 1 – 15.

Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294 - 299.

Gittenberger E. 2000. Triple homoplasy in the clausilial apparatus: a columellar knob in Alopinae (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Journal of Molluscan Studies*. 66: 129 – 130.

Guindon S., J. Dufayard, V. Lefort *et al.* 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 59 (3): 307 – 321.

Hall, T. A. 1999. «Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT». *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95 – 98.

Hebert P., A. Cywinska, S. Ball & J. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. 270: 313 – 332

Hirano T., Y. Kameda, K. Kimura and S. Chiba. 2014. Substantial incongruence among the morphology, taxonomy, and molecular phylogeny of the land snails *Aegista*, *Landouria*, *Trishoplita*, and *Pseudobuliminus* (Pulmonata: Bradybaenidae) occurring in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 70: 171 – 181.

Hirai J, S. Shimode & A. Tsuda. 2013. Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *J. Plankton Res*. 35(3): 644 – 656.

Huang X. & A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 9: 868-877.

Irikov A., D. Georgiev. 2015. Identification Keys to the Clausiliidae J. E. Gray, 1855 (Mollusca: Stylommatophora) from Bulgaria. *Acta zool. Bulg.* 67 (2): 167 – 177

Kearse M., R. Moir, A. Wilson *et al.* 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28 (12): 1647 – 1649.

Kerpedjiev P., S. Hammer, I. Hofacker. 2015. Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams. *Bioinformatics*. 31(20): 3377 – 3379.

- Kjer K. 1995. Use of rRNA secondary structure in Phylogenetic studies to identify homologous positions: An example of alignment and data presentation from frogs. *Molecular phylogenetics and evolution* vol. 4, No. 3, pp. 314 – 330.
- Koch E., M. Neiber, F. Walther & B. Hausdorf. 2016. Presumable incipient hybrid speciation of door snails in previously glaciated areas in the caucasus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 97: 120 – 128.
- Kornilios P., E. Stamatakis & S. Giokas. 2015. Multiple reversals of chirality in the land snail genus *Albinaria* (Gastropoda, Clausiliidae). *Royal Swedish Academy of Science*. 44: 603 – 611.
- Kress J., C. García-Robledo, M. Uriarte & D. Erickson. 2014. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 30 (1): 25 – 35.
- Kumar A. & J. Kaur. 2014. Primer based approach for PCR amplification of high GC Content gene: mycobacterium gene as a model. *Molecular Biology International*. 2014: 937308.
- Larkin M., G. Blackshields, N. Brown *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21): 2947 – 2948.
- Li Y., Z. Tang., D. Wang *et al.* 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Nature. Scientific reports*. 4: 4089.
- Loosjes F.E. 1953. Monograph of the Indo-Australian Clausiliidae (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae, Phaedusinae). *Beaufortia*. 3 (31): 1 – 226.
- Loosjes F.E. & A.C. Loosjes-Van Bommel. 1966. Some anatomical, systematical and geographical data on Neniinae (Gastropoda, Clausiliidae). *Zoologische Verhandelingen, Leiden*. 77: 1 – 59.
- Lorenz T. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. (63): e3998
- Lydeard C., W. Holznagel, M. Schnare & R. Gutell. 2000. Phylogenetic analysis of molluscan mitochondrial LSU rDNA sequences and secondary structures. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15 (1): 83 – 102.
- Madden T. 2002. The BLAST sequence Analysis Tool. In: McEntyre J., J. Ostell. 2002. *The NCBI Handbook*, Chapter 16. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information.
- Mahmoud M. & S. Busais. 2012. Phylogenetic relationships of the land snail; *Eobania vermiculata* (Müller, 1774) from Egypt and Saudi Arabia. A combined morphological and molecular analysis. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 65: 144 – 151.

Mammedov T., E. Pienaar, S. Whitney *et al.* 2008. A fundamental Study of the PCR Amplification of GC-Rich DNA Templates. *Computational Biology and Chemistry*. 32 (6): 452 – 457.

McArthur A. & M. Harasewych. 2003. Molecular Systematics of the major lineages of the Gastropoda. In: Lydeard & Lindberg (eds). *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusk*. Smithsonian Books. 140 – 160.

McCarthy C. 1996. Chromas: version 2.0. Technelysium PTY, Australia.

Meyer C. & G. Paulay G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLOS Biology*. 3 (12): e422.

Nordsieck H. 1979. Zur Anatomie und Systematik der Clausilien, XXI. Das System der Clausilien, II: Die rezenten europäischen Clausilien. *Archiv für Molluskenkunde*. 109 (4/6): 249-275.

Nordsieck H. 1982a. Die Evolution des Verschlußapparats der Schließmundschnecken (Gastropoda: Clausiliidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 112 (1/6): 27 – 43.

Nordsieck H. 1999. Critical revision of some Peruvian Neniinae treated by Loosjes & Loosjes-van Bemmelen (1966, 1984, 1989), with the description of new taxa (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae). *Basteria*. 63: 171 – 183.

Nordsieck H. 1999. *Symptychiella annae* n. sp., an extraordinary clausiliid from northern Peru (Gastropoda Pulmonata: Clausiliidae). *Basteria*. 63: 165 – 170.

Nordsieck, H. 2005. Revision of the system of the Peruvian Neniinae, with description of new taxa (Gastropoda: Stylommatophora: Clausiliidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 134 (2): 197-221.

Nordsieck, H. 2010. New taxa of the subfamilies Neniinae and Garnieriinae (Gastropoda: Stylommatophora: Clausiliidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 139 (1): 45 – 69.

Nylander J. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Available from: <http://www.abc.se/~nylander/>. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Ortega, H. 1992. Biogeografía de los peces neotropicales de aguas continentales del Perú. In: K.R. Young y N. Valencia (eds.), *Biogeografía, ecología, y Conservación del Bosque Montano en el Perú*. Memorias Museo de Historia Natural, U.N.M.S.M. 21: 39-45.

Ortega H., M. Hidalgo, G. Trevejo *et al.* 2012. Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. Ministerio del Ambiente, Dirección General de Diversidad Biológica - Museo de Historia Natural, UNMSM.

- Pall-Gergely B., P. Kornilios & S. Giokas. 2012. Higher than anticipated diversity within an *Albinaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) in southern Turkey. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. 18: 325 – 352.
- Pacheco V., R. Cadenillas, E. Salas *et al.* 2009. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 16 (1): 5 – 32.
- Plenge, M.A. 2010. List of the Birds of Peru. SERNANP. Perú.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25(7): 1253 – 1256.
- Ramírez R., C. Paredes & J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. *Revista de Biología Tropical*. 51 (3): 225 – 284.
- Ramírez R. 2004. Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do deserto da costa central do Perú. Doutorado em Zoologia. Faculdade de Biociências, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Ramírez J. & R. Ramírez. 2010. Analysis of the secondary structure of mitochondrial LSU rRNA of Peruvian land snails (Orthalicidae: Gastropoda). *Revista Peruana de Biología*. 17 (1): 053 – 057.
- Ramírez R., V. Borda, P. Romero *et al.* 2012. Biodiversidad y endemismo de los caracoles terrestres *Megalobulimus* y *Systrophia* en la Amazonia occidental. *Revista Peruana de Biología*. 19 (1): 59 – 74.
- Ratnasingham S., & P. Hebert. 2007. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*. 7(3), 355–364.
- Reynel C., R. Pennington & T. Sarkinen. 2013. Sarkinen. “Dinámica y cronología del levantamiento de los andes peruanos” – Cómo se formó la diversidad ecológica del Perú. 169 – 174.
- Ronquist F. & J. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19 (12): 1572 – 1574.
- Rozas J., J. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19 (18): 2496 – 2497.
- Sanín M., W. Kissling, C. Bacon *et al.* 2016. The Neogene rise of the tropical Andes facilitated diversification of wax palms (Ceroxylon: Arecaceae) through geographical colonization and climatic niche separation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182(2).
- Schindel & Miller. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomist. *Nature* 435 (7038): 17.

- Simion P., H. Philippe, D. Baurain *et al.* 2017. A large and consistent phylogenomic Dataset supports sponges as the sister group to all other animals. *Current Biology*. 27: 958 – 967.
- Solem. 1984. A world model of land snail diversity and abundance. In Solem & Van Bruggen (eds.). *World-Wide Snails. Biogeographical Studies on Non-Marine Mollusca*. Leiden: E. J. Brill.
- Sonnenberg R., A. Nolte & D. Tautz. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*. 4:6.
- Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite. JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28: 1102 – 1104.
- Swenson J., B. Young, S. Beck *et al.* 2012. Plant and Animal endemism in the eastern Andean slope: Challenges to conservation. *BMC Ecology*. 12:1.
- Szekeres M. 1984. Some notes on the distribution of the South American Clausiliidae (Gastropoda, Pulmonata). In: Solem & Van Bruggen (eds.). *World-Wide Snails. Biogeographical Studies on Non-Marine Mollusca*. Leiden: E. J. Brill.
- Tamura K., D. Peterson *et al.* 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10): 2731 – 2739.
- Taylor J., S. Williams, E. Glover & P. Dyal. 2007. A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta*. 36 (6): 587 – 606.
- Timón-Gómez A., E. Nyvltova, L. Abriata *et al.* 2018. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 76: 163 – 178.
- Uit de Weerd D. 2008. Delimitation and Phylogenetics of the diverse land-snail family Urocoptidae (Gastropoda: Pulmonata) based on 28S rRNA sequence data: A reunion with cerion. *Journal of Molluscan Studies*. 74: 317 – 329.
- Uit de Weerd D. & E. Gittenberger. 2013. Phylogeny of the land snail family Clausiliidae (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67 (1): 201 – 216.
- Uit de Weerd D.R., D. Robinson & G. Rosenberg. 2016. Evolutionary and biogeographical history of the land snail family Urocoptidae (Gastropoda: Pulmonata) across the Caribbean region. *Journal of Biogeography*. 43: 763 – 777.
- Vaidya G., D. Lohman and R. Meier. 2010. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*. 27: 171 – 180.

Van Moorsel C., E. Dijkstra and E. Gittenberger. 2000. Molecular evidence for repetitive parallel evolution of shell structure in Clausiliidae (Gastropoda, Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17 (2): 200 – 208.

Wade C. & P. Mordan. 2000. Evolution within the gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *Journal of Molluscan Studies*. 66: 565 – 570.

Xia X. & Z. Xie. 2001. «DAMBE: Software Package for Data Analysis in molecular Biology and Evolution». *Journal of Heredity*. 92 (4): 371 – 373.

Zhang H., M. Lv, W. Yi *et al.* 2017. Species diversity can be overestimated by a fixed empirical threshold: insights from DNA barcoding of the genus *Cletus* (Hemiptera: Coreidae) and the meta-analysis of COI data from previous phylogeographical studies. *Molecular Ecology Resources*. 17 (2): 314 – 323

11. ANEXOS

Anexo nº1. Divergencia genética entre las secuencias de COL obtenidas

	o93	o94	o95	o96	o97	T25	T26	o98	r2	o100	r1	o99	T22	T24	T23	o70	o71	T11	T12	T13	o68	o72	o67	o69	S77	S78	S75
Ley-o93																											
Ley-o94	0																										
Ley-o95	0	0																									
Ley-o96	0	0	0																								
Ley-o97	0	0	0	0																							
Ley-T25	0	0	0	0	0																						
Ley-T26	0	0	0	0	0	0																					
Andviol-o98	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209																				
Andviol-r2	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0																			
Andviol-o100	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0	0																		
Andviol-r1	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0.209	0	0	0																	
Andviol-o99	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.001	0.002	0.001	0.001																
Andviol-T22	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.001	0.002	0.001	0.001	0															
Andviol-T24	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.001	0.002	0.001	0.001	0	0														
Andviol-T23	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.213	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001													
ST-o70	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21												
ST-o71	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21	0											
STCc-t11	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21	0	0										
STCc-t12	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21	0	0	0									
STCc-t13	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21	0	0	0	0								
ST-o68	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.208	0.218	0.208	0.208	0.206	0.206	0.206	0.208	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0						
ST-o72	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.208	0.218	0.208	0.208	0.206	0.206	0.206	0.208	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0						
ST-o67	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.21	0.22	0.21	0.21	0.208	0.208	0.208	0.21	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001					
ST-o69	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.215	0.206	0.218	0.206	0.206	0.204	0.204	0.204	0.206	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001	0.003				
Sympt-s77	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.252	0.26	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.254	0.259	0.259	0.259	0.259	0.259	0.261	0.261	0.263	0.259			
Sympt-s78	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.252	0.26	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.254	0.259	0.259	0.259	0.259	0.259	0.261	0.261	0.263	0.259	0		
Sympt-s75	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.252	0.26	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.254	0.259	0.259	0.259	0.259	0.259	0.261	0.261	0.263	0.259	0	0	
Sympt-s76	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.249	0.252	0.26	0.252	0.252	0.252	0.252	0.252	0.254	0.259	0.259	0.259	0.259	0.259	0.261	0.261	0.263	0.259	0	0	0